

Université de Montréal

**Étude dans la cellule β pancréatique de voies inhibitrices
de la sécrétion d'insuline liées au métabolisme des lipides**

par

Émilie Pepin

Programme de Biologie Moléculaire
Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de doctorat
en Biologie Moléculaire

Mars 2013

© Émilie Pepin, 2013

Résumé

Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie métabolique complexe causée par des facteurs génétiques mais aussi environnementaux, tels la sédentarité et le surpoids. La dysfonction de la cellule β pancréatique est maintenant reconnue comme l'élément déterminant dans le développement du DT2. Notre laboratoire s'intéresse à la sécrétion d'insuline par la cellule β en réponse aux nutriments calorigéniques et aux mécanismes qui la contrôlent. Alors que la connaissance des mécanismes responsables de l'induction de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras est assez avancée, les procédés d'inhibition de la sécrétion dans des contextes normaux ou pathologiques sont moins bien compris. L'objectif de la présente thèse était d'identifier quelques-uns de ces mécanismes de régulation négative de la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique, et ce en situation normale ou pathologique en lien avec le DT2.

La première hypothèse testée était que l'enzyme mitochondriale hydroxyacyl-CoA déshydrogénase spécifique pour les molécules à chaîne courte (*short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*, SCHAD) régule la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG) par la modulation des concentrations d'acides gras ou leur dérivés tels les acyl-CoA ou acyl-carnitine dans la cellule β . Pour ce faire, nous avons utilisé la technologie des ARN interférants (ARNi) afin de diminuer l'expression de SCHAD dans la lignée cellulaire β pancréatique INS832/13. Nous avons par la suite vérifié chez la souris DIO (*diet-induced obesity*) si une exposition prolongée à une diète riche en gras activerait certaines voies métaboliques et signalétiques assurant une régulation négative de la sécrétion d'insuline et contribuerait au développement du DT2. Pour ce faire, nous avons mesuré la SIIG, le métabolisme intracellulaire des lipides, la fonction mitochondriale et l'activation de certaines voies signalétiques dans les îlots de Langerhans isolés des souris normales (ND, *normal diet*) ou nourries à la diète riche en gras (DIO).

Nos résultats suggèrent que l'enzyme SCHAD est importante dans l'atténuation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides aminés. En effet, l'oxydation des

acides gras par la protéine SCHAD préviendrait l'accumulation d'acyl-CoA ou de leurs dérivés carnitine à chaîne courtes potentialisatrices de la sécrétion d'insuline. De plus, SCHAD régule le métabolisme du glutamate par l'inhibition allostérique de l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH), prévenant ainsi une hyperinsulinémie causée par une sur-activité de GDH.

L'étude de la dysfonction de la cellule β dans le modèle de souris DIO a démontré qu'il existe une grande hétérogénéité dans l'obésité et l'hyperglycémie développées suite à la diète riche en gras. L'originalité de notre étude réside dans la stratification des souris DIO en deux groupes : les faibles et forts répondants à la diète (low diet responders (LDR) et high diet responder (HDR)) sur la base de leur gain de poids corporel. Nous avons mis en lumière divers mécanismes liés au métabolisme des acides gras impliqués dans la diminution de la SIIG. Une diminution du flux à travers le cycle TG/FFA accompagnée d'une augmentation de l'oxydation des acides gras et d'une accumulation intracellulaire de cholestérol contribuent à la diminution de la SIIG chez les souris DIO-HDR. De plus, l'altération de la signalisation par les voies AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et PKC ϵ (protéine kinase C ϵ) pourrait expliquer certaines de ces modifications du métabolisme des îlots DIO et causer le défaut de sécrétion d'insuline. En résumé, nous avons mis en lumière des mécanismes importants pour la régulation négative de la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique saine ou en situation pathologique. Ces mécanismes pourraient permettre d'une part de limiter l'amplitude ou la durée de la sécrétion d'insuline suite à un repas chez la cellule saine, et d'autre part de préserver la fonction de la cellule β en retardant l'épuisement de celle-ci en situation pathologique. Certaines de ces voies peuvent expliquer l'altération de la sécrétion d'insuline dans le cadre du DT2 lié à l'obésité. À la lumière de nos recherches, le développement de thérapies ayant pour cible les mécanismes de régulation négative de la sécrétion d'insuline pourrait être bénéfique pour le traitement de patients diabétiques.

Mots-clés: Régulation négative, sécrétion d'insuline, diabète de type 2, îlots de Langerhans, métabolisme lipidique, short-chain hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, acides

gras, *AMP-activated protein kinase*, protéine kinase C ϵ , cholestérol, dysfonction mitochondriale, acyl-CoA, *acyl-carnitine*, *diet-induced obesity*, *low diet responder*, *high diet responder*.

Abstract

Type 2 diabetes (T2D) is a complex metabolic disease caused by genetic as well as environmental factors, such as sedentarity and obesity. Pancreatic β cell dysfunction is now recognized as the key factor in T2D development. Our laboratory is studying the mechanisms of regulation of insulin secretion by the pancreatic β cell in response to nutrients. While the knowledge of the mechanisms responsible for initiation of insulin secretion in response to glucose and fatty acids is quite advanced, the inhibitory processes of insulin secretion in normal or pathological situations are still poorly understood. This doctoral thesis has focused on the identification of some of the mechanisms responsible for negative regulation of insulin secretion in pancreatic β cell. We have addressed this issue under normal situation or pathological conditions related to T2D.

We first tested the hypothesis by which a mitochondrial enzyme, short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (SCHAD), negatively regulates glucose-induced insulin secretion (GIIS) by limiting the concentrations of some fatty acids and their derivatives such as acyl-CoA or acyl-carnitine molecules in the β cell. For this purpose, the downregulation of SCHAD by RNA interference (RNAi) was used in the pancreatic β cell line INS832/13. Then, we tested whether a prolonged administration of high-fat diet to mice (diet-induced obesity mouse model, DIO) would modulate intracellular metabolic and molecular pathways responsible for inhibition of insulin secretion. C57BL/6 mice were therefore fed a high-fat diet for 8 weeks followed by insulin secretion, intracellular lipid metabolism, mitochondrial function and intracellular signaling measurements on isolated pancreatic islets of Langerhans of those mice.

Our results suggest that SCHAD negatively regulates GIIS and amino acid-induced insulin secretion. We propose that fatty acid oxidation by SCHAD would prevent the accumulation of short-chain acyl-CoAs or acyl-carnitines capable of potentiating insulin secretion. In addition, SCHAD regulates glutamate metabolism by the allosteric inhibition

of glutamate dehydrogenase (GDH) preventing the hyperinsulinemia caused by excessive GDH activity.

The study of β cell dysfunction in the DIO mouse model stratified LDR and HDR highlighted various fatty acid metabolism pathways involved in the reduction of GIIS. A decrease in the triglycerides/free fatty acid (TG/FFA) cycling associated with an increase in fatty acid oxidation and intracellular accumulation of cholesterol was shown to contribute to the decreased GIIS in DIO-HDR mice. Furthermore, alteration of AMP-activated kinase (AMPK) and protein kinase C ϵ (PKC ϵ) signaling pathways would be responsible for those alterations in metabolic pathways observed in DIO islets and cause decreased insulin secretion. In summary, we have shed light on important pathways negatively regulating insulin secretion in pancreatic β cell. These pathways could either limit the amplitude or duration of insulin secretion after a meal, or help to preserve β -cell function by delaying exhaustion. Some of those signaling pathways could explain the altered insulin secretion observed in T2D obese patients. In light of our research, the development of therapies targeting pathways that negatively regulate insulin secretion may be beneficial for treating diabetic patients.

Keywords: Negative regulation, insulin secretion, type 2 diabetes, islets of Langerhans, lipid metabolism, short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, fatty acids, AMP-activated kinase, protein kinase C ϵ , cholesterol, mitochondrial dysfunction, acyl-CoA, acyl-carnitine, low diet responder, high diet responder.

Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract	v
Table des matières.....	vii
Liste des figures	x
Liste des tableaux.....	xi
Liste des abréviations.....	xii
Remerciements.....	xix
Introduction.....	1
Chapitre 1. Le diabète	2
1.1 Les différents types de diabète.....	6
1.2 Le diabète de type 2	8
1.2.1 Gènes de prédisposition au diabète de type 2	8
1.2.2 La résistance à l'insuline.....	10
1.2.3 Compensation et dysfonction de la cellule β	14
1.2.4 Stades de développement du diabète de type 2.....	16
1.3 Les différents modèles animaux de diabète	19
Chapitre 2. Voies métaboliques impliquées dans le contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras libres	21
2.1 Le métabolisme oxydatif du glucose	21
2.1.1 La glycolyse	21
2.1.2 Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de Krebs	24
2.1.3 L'anaplérose et la cataplérose	26
2.1.4 La respiration mitochondriale	31
2.2 Le métabolisme oxydatif des acides gras.....	33
2.2.1 Le malonyl-CoA : substrat et régulateur du métabolisme des lipides	35
2.2.2 L'oxydation des acides gras	37

2.2.3 Enzymologie de la β -oxydation en fonction de la longueur de la chaîne carbonée	39
2.3 Le cycle Triglycérides/Acides gras libres (TG/FFA)	41
Chapitre 3. Les voies principales de sécrétion d'insuline de la cellule β pancréatique en réponse aux nutriments calorigéniques	45
3.1 Voie classique de la sécrétion d'insuline	47
3.2 Voie d'amplification de la sécrétion d'insuline	49
Chapitre 4. Enzymes et voies métaboliques associées à une régulation négative de la sécrétion d'insuline	54
4.1 SCHAD, un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline	54
4.2 PKC ϵ , régulateur de la sécrétion en présence d'acides gras	57
4.3 AMPK, un senseur énergétique de la cellule	61
Chapitre 5. Mise en contexte de la thèse	67
5.1 Problématique générale	67
5.2 Hypothèses	68
5.3 Objectif général	69
5.4 Objectifs spécifiques	69
5.5 Publications	70
Chapitre 6. Résultats	71
Mise en contexte de l'article 1	72
Article 1	74
Mise en contexte de l'article 2	104
Article 2	106
Mise en contexte de l'article 3	147
Article 3	149
Chapitre 7. Discussion	176
7.1 SCHAD, une protéine assurant une régulation négative de la sécrétion d'insuline: mécanisme potentiellement impliqué	178

7.2	SCHAD, une protéine multifonctionnelle qui contrôlant l'activité de GDH.....	181
7.3	L'importance de SCHAD dans la régulation de la sécrétion d'insuline par la cellule β	185
7.4	Le rôle de SCHAD dans le métabolisme d'autres tissus en situation non-pathologique.....	186
7.5	L'implication de SCHAD dans le développement du DT2	187
7.6	La dysfonction de la cellule β chez la souris DIO	189
7.7	Implication du métabolisme des acides gras sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline des souris DIO LDR et HDR	190
7.8	Métabolisme mitochondrial de la cellule β et défaut de sécrétion d'insuline dans les souris DIO.....	194
7.9	AMPK et sécrétion d'insuline dans la pathologie du DT2 lié à l'obésité.....	196
7.10	Autres considérations sur le rôle de l'AMPK dans la cellule β	198
7.11	PKC ϵ et sécrétion de l'insuline.....	199
7.12	Limitations des études présentées	202
Chapitre 8. Perspectives		204
Projet #1: Les acyl-CoA et -carnitine à courte chaîne sont-ils des facteurs de couplage métabolique?		205
Projet #2: SCHAD est-il impliqué dans l'hyperinsulinémie présente dans la phase compensatoire de la cellule β dans le pré-diabète?		207
Projet #3: La dysfonction mitochondriale de la cellule β est-elle causale dans le développement précoce du DT2?.....		208
Projet #4 : Quel est le rôle de l'AMPK dans la régulation du métabolisme des cellules β dans un contexte de DT2?		210
Chapitre 9. Conclusion.....		212
Bibliographie.....		215

Liste des figures

Figure 1. Anatomie générale du pancréas	2
Figure 2. Structure cellulaire de l'îlot de Langerhans chez le rongeur	4
Figure 3. Histoire naturelle du diabète de type 2	18
Figure 4. Voie métabolique de la glycolyse.....	23
Figure 5. Cycle des acides tricarboxyliques (TCA)	25
Figure 6. Les navettes anaplérotiques/cataplérotiques.....	29
Figure 7. Chaîne de transport des électrons	32
Figure 8. Le malonyl-CoA, régulateur du métabolisme des lipides	36
Figure 9. β -oxydation des acides gras	38
Figure 10. Localisation des différents isoformes des enzymes de la β -oxydation.....	40
Figure 11. Cycle Triglycérides/Acides gras libres	42
Figure 12: Formation de l'insuline et maturation des granules.....	46
Figure 13. Sécrétion d'insuline diphasique chez le rat et la souris.	47
Figure 14. Mécanismes classique et d'amplification de la sécrétion d'insuline induite par les nutriments dans la cellule β	49
Figure 15. Mécanismes possibles de sécrétion d'insuline accrue en absence de SCHAD	180
Figure 16. La multifonctionnalité de SCHAD	183
Figure 17. Expression des niveaux d'ARNm de SCHAD dans les îlots de souris DIO-HDR	189
Figure 18 Métabolisme du cholestérol dans la cellule β pancréatique	193

Liste des tableaux

Tableau 1 : Critères de diagnostique de l’hyperglycémie et du diabète selon l’Organisation Mondiale de la Santé.....	6
Tableau 2 : Quelques gènes dont les polymorphismes sont associés à une perte de fonction de la cellule β et au développement du DT2	9

Liste des abréviations

ACC1: Acétyl-CoA carboxylase 1

ACC2 : Acétyl-CoA carboxylase 2

ACSL: Acyl-CoA synthétase à chaîne longue

AD: Acyl-CoA déshydrogénase

ADN: Acide désoxyribonucléique

ADP: Adénosine di-phosphate

AG: Acide gras

AG-CoA: acyl-CoA

AGPAT: 1-acyl-sn-Gly-3-P acyltransferase

AICAR: 5-amino-1- β -D-ribofuranosyl-imidazole-4-carboxamide, analogue d'AMP

AMP: Adénosine mono-phosphate

AMPK: Protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate

aPKC: Protéine kinase C atypique

ApoB: Apolipoprotéine B

ARNm : ARN messenger

ATGL: *Adipose triglycerides lipase*

ATP: Adénosine triphosphate

ATPase: Adénosine tri-phosphate synthétase

β -Ox : β -oxydation des acides gras

CAMKK β : *Calmodulin-dependant protein kinase kinase β*

CC: Chaîne courte

CO₂ : Dioxyde de carbone (*carbon dioxyde*)

cPKC : Protéine kinase C classique

CPT1: Carnitine palmytoyl-transférase 1

CPT2: Carnitine palmytoyl-transférase 2

CS: Citrate synthétase

CTE: Chaîne de transport des électrons

DAG: Diacylglycérol

DHAP: Dihydroxyacétone phosphate

DIO : *Diet-induced obesity*

DT2: Diabète de type 2

eEF2: *Elongation factor 2*

EH: Enoyl-CoA hydratase

ENPP: *Ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase protein*

FABP: *Fatty acid binding protein*

FADH₂: Flavine adénine dinucléotide (FAD), forme hydroquinone

FAS: *Fatty acid synthase*

FCCP: Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone

FCM: Facteur de couplage métabolique

FDH: Fumarate déshydrogénase

FOXO: Classe O de la famille des protéines *Forkhead box*

GAP: Glyceraldéhyde-3-phosphate

GDH: Glutamate déshydrogénase

GK : Glycérol kinase

GLP-1: *Glucagon-like peptide 1*

GLUT1: *Glucose transporter 1*

GLUT2: Transporteur de glucose 2

GLUT4: *Glucose transporter 4*

Gly: Glycérol

Gly3P: Glycérol-3-phosphate

GPAT: Glycérol-3-phosphate acyl transférase

GPCR: *G-protein coupled receptor*

GPR120: *G-protein-coupled receptor 120*

GPR40: Récepteur couplé aux protéines G 40

GTP: Guanosine triphosphate
 GWAS: *Genome-wide association study*
 HAD: Hydroxyacyl-CoA déshydrogénase
 HDL: *High-density lipoprotein*
 HDR: *High-diet responder*
 HGF: *Hepatocyte growth factor*
 HHX: *Hematopoietically-expressed homeobox protein*
 HMGCR: hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A réductase
 HNF1: *Hepatocyte nuclear factor 1*
 HNF4: *Hepatocyte nuclear factor 4*
 HSL: *Hormone-sensitive lipase*
 IDE: *Insulin degrading enzyme*
 IDH: Isocitrate déshydrogénase
 IGF1: *Insulin-like growth factor 1*
 IGF2: *Insulin-like growth factor 2*
 IGT: *Impaired glucose tolerance*
 IL-6: Interleukine-6
 IP3: Inositol triphosphate
 IPF1: *Insulin promoter factor 1*
 IRS1: *Insulin receptor substrate 1*
 IRS2: *Insulin receptor substrate 2*
 IVGTT: *Intravenous glucose tolerance test*
 K_{ATP} canal: *ATP-sensitive potassium channel*
 αKGDH: α-cétoglutarate déshydrogénase
 Kir6.2: *Potassium inwardly-rectifying channel 6.2*
 KT: *Ketoacyl-CoA thiolase*
 LC: Chaîne longue
 LC-CoA: *Long-chain coenzyme A*

LCEH: *Long-chain enoyl-CoA hydratase*
 LCHAD: *Long-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*
 LCKAT: *Long-chain ketoacyl-CoA thiolase*
 LDL: *Low-density lipoprotein*
 LDR: *Low-diet responder*
 LKB1: *Liver kinase B1* aussi appelée *Serine/threonine kinase 11 (STK11)*
 LPA: *Lisophosphatidic acid*
 MAG: Monoacylglycérol
 MC: Moyenne chaîne
 MCP-1: *Monocyte chemotactic protein-1*
 MDG: Malate déshydrogénase
 MGL: Monoacylglycérol lipase
 MODY: *Maturity onset diabetes of the young*
 Munc13: *Mammalian homologues of the C. elegans unc-13*
 mTOR: *Mammalian target of rapamycin*
 NAD: Nicotinamide adénine dinucléotide, forme oxydée
 NADH: Nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite
 NEUROD: *Neurogenic differentiation*
 NGT: *Normal glucose tolerance*
 nPKC : Protéine kinase C nouvelle
 OGTT: *Oral glucose tolerance test*
 β -OX: β -oxydation
 PA: *Phosphatidic acid*
 PAP: *Phosphatidic acid phosphate*
 PC: Pyruvate carboxylase
 PDH: Pyruvate déshydrogénase
 PDX-1: *Pancreatic and duodenal homeobox 1*
 PEPCK: Phosphoénolpyruvate carboxykinase

PFK: Phosphofructokinase
 PFK-C: Phosphofructokinase de type C
 PFK-L: Phosphofructokinase du foie (*liver*)
 PFK-M: Phosphofructokinase du muscle
 PI3K: *Phosphatidylinositol 3-kinase*
 PKB: Protéine kinase B
 PKC: Protéine kinase C
 PGC-1 α : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*
 PMA: Phorbol-myristate-13-acétate
 PPAR γ : *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma*
 ROS: *Reactive oxygen species*
 SCHAD: *Short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*
 SCS: Succinyl-CoA synthétase
 SDH: Succinate déshydrogénase
 SIRT1: *Sirtuin 1* aussi appelée *NAD⁺-dependent deacetylase sirtuin-1*
 SLC30A8: *Solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8*
 sn2-3-DAG: sn2-3 diacylglycérol
 SNP: *Single-nucleotide polymorphism*
 SNS: *Sympathetic nervous system*
 SREBP-1C: *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins 1C*
 SUR1: *Sulfonylurea receptor 1*
 TCA: *Tricarboxylic acid*
 TCF7L2: *Transcription factor 7-like 2*
 TG: Triacylglycérol
 TG/FFA: Triglycérides/acides gras libres
 TNF α : *Tumor necrosis factor α*
 TSC2: *Tuberous sclerosis protein 2*
 TZD: *Thiazolidinedione*

VDCC: *Voltage-dependant calcium channel*

VLCAD: *Very-long chain acyl-CoA dehydrogenase*

VLDL: *Very low-density lipoprotein*

ZnT8: *Zinc transporter 8*

ZF: *Zucker Fatty*

ZDF: *Zucker Diabetic Fatty*

Il faut chercher avec le cœur

Le petit Prince

À la plus belle des surprises qui est arrivée en fin de thèse,

À mon amoureux pour son soutien constant,

À tous ceux qui m'ont fourni encouragements et coup de pieds au popotin,

Vous savez qui vous êtes

Je vous dédie cette thèse!

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier mon directeur de thèse, Dr Marc Prentki, qui a su me donner un environnement riche et propice à l'apprentissage, des projets motivants, parfois ardu, mais au cœur desquels la scientifique en moi a beaucoup grandi.

Merci aux trois seniors de notre laboratoire, Erik Joly, Murthy Madiraju et Marie-Line Peyot, qui chacun à votre façon m'ont guidée et m'ont appris beaucoup.

Merci aux membres du laboratoire Prentki, passés et actuels, avec qui presque (!) chaque jour fût une partie de plaisir! Un merci tout particulier aux techniciennes qui rendent notre travail tellement plus facile, et dont la valeur n'est pas toujours bien reconnue! Vous êtes les piliers du labo! Merci d'être là pour nous!

À Hugo, futur papa, merci d'être à mes côtés, de me motiver et surtout de croire en moi!

Merci à ma famille toujours présente! Pour les encouragements, les corrections, les bons mots, votre patience! Pour les tout-petits nouvellement arrivés qui furent des petits rayons de soleil dans cette fin de doctorat!

Finalement, un gros merci à mes amis, ma deuxième famille, scientifiques ou non, qui me donnèrent les multiples exutoires nécessaires à ma santé mentale. À nos expéditions, nos discussions, nos bières, nos verres de vins, nos bouffes! Car c'est aussi ça la vie!

Introduction

Chapitre 1. Le diabète

Le pancréas est une glande abdominale associée au tube digestif, la plus grosse en volume du corps humain après le foie. Il est divisé en plusieurs parties, dont la tête, le corps et la queue (Figure 1). Le pancréas possède une double fonction : la première, exocrine, par la sécrétion de sucs gastriques dans le duodénum et la seconde, endocrine, par la sécrétion d'hormones dans la circulation sanguine.

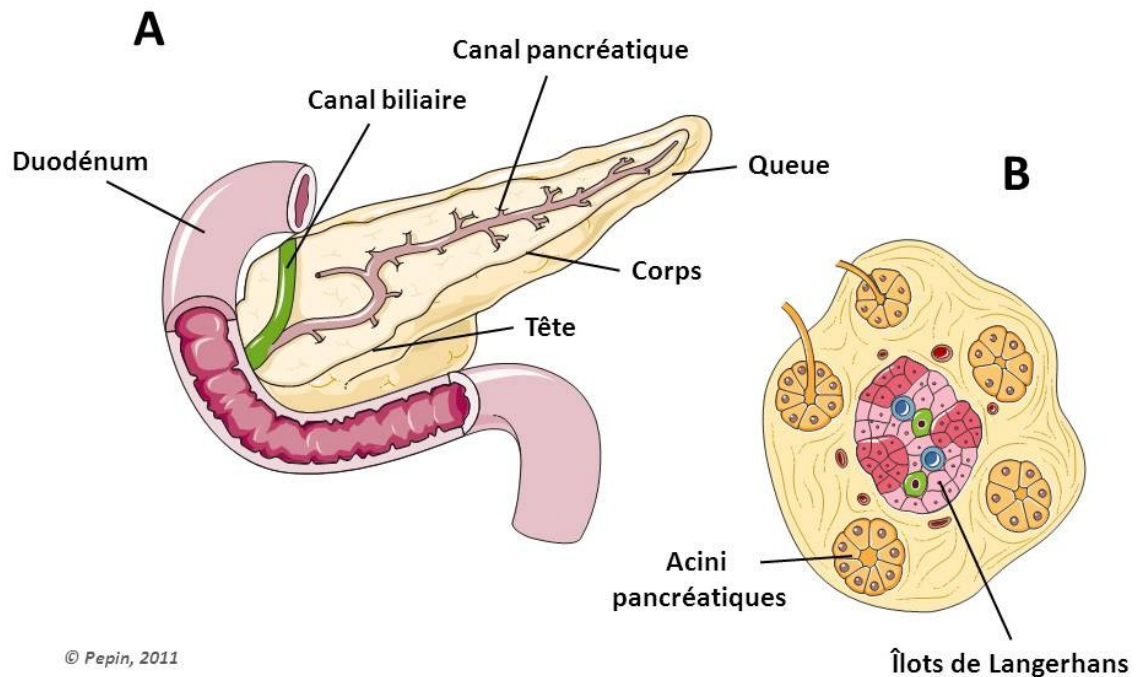


Figure 1. Anatomie générale du pancréas

(A) Anatomie macroscopique du pancréas et sa connexion au duodénum. (B) Anatomie détaillée du pancréas. Les unités fonctionnelles exocrines (acini) et endocrines (îlots de Langerhans) sont dispersées à travers tout le pancréas (Schéma réalisé à partir de Servier Medical Art www.servier.fr/servier-medical-art).

La partie exocrine du pancréas représente 95% de la masse totale de l'organe (*Jain et Lammert, 2009*). Elle est constituée de cellules acinaires qui sont organisées sous forme

d'acini connectés à des canaux. Ces cellules sécrètent le suc pancréatique dans la lumière de l'acinus, qui se déverse dans le canal pancréatique et qui est finalement acheminé jusqu'au duodénum. Le suc pancréatique aide à hydrolyser les hydrates de carbone, les protéines et le gras contenus dans le chyme. Il contient du bicarbonate qui le rend alcalin, ce qui permet de neutraliser l'acidité du chyme. Il contient aussi les enzymes amylase, lipase, colipase et phospholipase ainsi que deux pro-enzymes : trypsinogène et chymotrypsinogène. Ces pro-enzymes sont clivées et activées par les enzymes de la bordure en brosse de l'intestin. La sécrétion sous la forme de pro-enzymes inactives prévient la digestion des cellules qui les produisent et permet leur accumulation dans des vésicules intracellulaires, jusqu'à l'induction régulée de leur sécrétion (*Silverthorn*, 1998). Les hormones gastrine, cholecystokinine et sécrétine assurent la régulation de la sécrétion exocrine pancréatique. Ces hormones sont produites par l'estomac et le duodénum en réponse soit à une distension physique ou à la présence d'aliments, suite à la prise alimentaire.

La portion endocrine du pancréas (Figures 1B et 2) ne représente que 5 % de la masse totale de l'organe. Elle est organisée sous la forme de petites structures qui furent découvertes en 1869 par l'anatomiste Paul Langerhans (*Langerhans*, 1869), qui leur a donné son nom: les îlots de Langerhans. Les îlots sont dispersés à travers tout le tissu exocrine du pancréas. Ils sécrètent les hormones dans l'espace extracellulaire et la proximité intra- îlot de capillaires sanguins permet la diffusion des hormones dans le sang. Les îlots sont composés de cinq types cellulaires différents: α , β , δ , ϵ et PP. Chez l'humain, la cellule β représente environ 50 % des cellules de l'îlot, et sécrète l'insuline, une hormone hypoglycémiante. La cellule α est le deuxième type cellulaire le plus abondant, composant environ 35 % de l'îlot chez l'humain et sécrète le glucagon, une hormone hyperglycémiante antagoniste de l'insuline. La cellule δ (5 % de l'îlot) sécrète la somatostatine qui agit de façon paracrine pour inhiber la sécrétion de l'insuline, du glucagon et du polypeptide pancréatique (*Silverthorn*, 1998). Les cellules ϵ et PP sécrètent respectivement la ghréline et le polypeptide pancréatique, et sont présentes en très petit nombre dans l'îlot. La ghréline

est sécrétée avant les repas et agit sur l'hypothalamus pour stimuler l'appétit (*Inui et al*, 2004) en plus d'inhiber la sécrétion d'insuline (*Dezaki et al*, 2007). Le polypeptide pancréatique est sécrété après un repas et inhibe toute sécrétion pancréatique, à la fois endocrine et exocrine (*Kojima et al*, 2007).

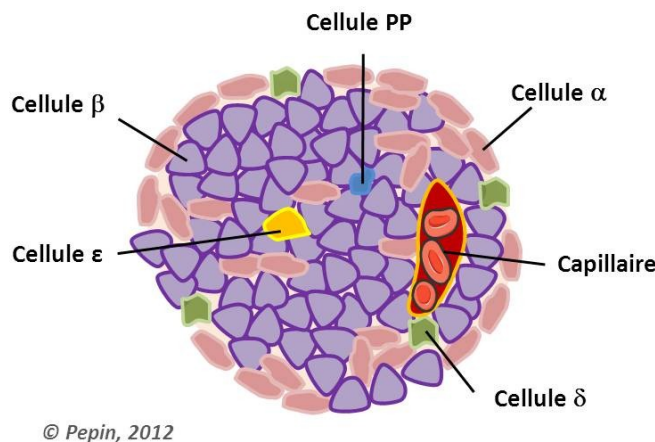


Figure 2. Structure cellulaire de l'îlot de Langerhans chez le rongeur

L'îlot de Langerhans est composé de cinq types cellulaires différents : β , α , δ , ϵ et PP. Il est aussi perfusé par des capillaires permettant la circulation des hormones sécrétées par les cellules de l'îlot dans tout le corps (Schéma réalisé à partir de Servier Medical Art, www.servier.fr/servier-medical-art).

L'architecture de l'îlot varie en fonction de l'espèce étudiée. Chez les rongeurs, la périphérie de l'îlot est constituée principalement de cellules α , δ , ϵ et PP, alors que les cellules β (qui représentent 80% des cellules totales de l'îlot) sont regroupées dans le centre (*Orci et Unger*, 1975). Cependant, de nouvelles études ont démontré que les cellules α , δ , ϵ et PP ne forment pas un manteau complet autour de l'îlot, mais qu'une petite quantité de cellules β se trouve aussi en périphérie (*Kharouta et al*, 2009; *Steiner et al*, 2010). Chez l'humain, la distribution des cellules de l'îlot est beaucoup plus aléatoire, et le ratio de cellules α/β est plus élevé que chez les rongeurs (*Steiner et al*, 2010). Les différences

d'architectures peuvent entraîner des différences fonctionnelles, d'où l'importance de confirmer les résultats obtenus avec des îlots de rongeur dans les îlots humains.

L'insuline est l'hormone hypoglycémisante du corps humain qui est responsable de la captation du glucose sanguin par les tissus périphériques cibles (foie, muscles, tissu adipeux). Elle est produite sous la forme d'une pro-hormone, la proinsuline, qui possède une activité physiologique similaire à l'insuline, mais de moins grande envergure. En effet, il a été démontré que la proinsuline peut induire une légère hypoglycémie chez le porc (*Lazarus et al*, 1970). La proinsuline est emmagasinée dans les granules de sécrétion où elle sera clivée par des proprotéines convertases afin de libérer un petit peptide, le peptide-C, et l'insuline mature, qui seront sécrétés de façon équimolaire lors de l'exocytose des granules.

Le diabète mellitus, ou diabète sucré, est une maladie métabolique caractérisée par un désordre de l'homéostasie de la concentration de glucose dans le sang (glycémie). La glycémie est maintenue autour des valeurs dites normales (inférieures à 7 mM chez un adulte à jeun (*CDA*, 2008)) et dépend principalement de deux paramètres physiologiques. Le premier est la sensibilité à l'insuline, soit la capacité des tissus périphériques cibles à répondre à l'action de l'insuline. Le second est la capacité des cellules β du pancréas à réguler la sécrétion de l'insuline en fonction de la concentration de glucose sanguin. Ainsi, l'augmentation de la glycémie observée chez les patients diabétiques est due, soit à une incapacité des cellules des tissus périphériques à réagir à la présence de l'insuline (nommée résistance à l'insuline), soit à une sécrétion insuffisante de l'insuline par le pancréas (dysfonction de la cellule β). Dans la majorité des cas, l'apparition du diabète de type 2 (DT2) résulte de la dysfonction partielle de ces deux paramètres de régulation de la glycémie.

**Tableau 1 : Critères de diagnostique de l'hyperglycémie et du diabète selon
l'Organisation Mondiale de la Santé**

<i>Diagnostic</i>	<i>Concentration plasmatique du glucose (mmol/L)</i>	
	à jeun	2h suivant la prise orale
Normoglycémique	< 6,1	< 7,8
Intolérance au glucose	< 7,0	entre 7,8 et 11,1
DT2	≥ 7,0	≥ 11,1

1.1 Les différents types de diabète

Il existe 3 types de diabète : le diabète de type 1 (anciennement appelé diabète juvénile), le DT2 et le diabète gestationnel. Tout d'abord, le diabète de Type 1, représente de 5 à 10 % des cas de diabète. C'est une maladie autoimmune menant à la destruction spécifique des cellules β pancréatiques, responsables de la sécrétion de l'insuline. Les cellules β étant la seule source d'insuline du corps humain, le traitement de ce type de diabète nécessite des injections quotidiennes d'insuline synthétique.

Le deuxième type de diabète, le DT2, était autrefois appelé diabète de l'âge mûr. Il représente environ 90 % des cas de diabète dans le monde (CDA, 2008). Il est causé principalement par une interaction de différents facteurs environnementaux tels que la sédentarité et l'alimentation avec une prédisposition multigénique (Gerard, 2005). Le DT2 se développe habituellement chez les personnes âgées de plus de 40 ans, mais un nombre accru de cas est répertorié chez les adolescents sédentaires obèses. Il résulte de l'incapacité des cellules β du pancréas à sécréter suffisamment d'insuline pour contrer la résistance des tissus cibles à l'action de l'insuline. Des études cliniques ont démontré qu'une intervention

précoce visant l'assainissement des habitudes nutritionnelles et une augmentation de l'activité physique permet de ralentir le développement du DT2, et que ces interventions sont plus efficaces que la prise de médicaments (*Knowler et al*, 2002). Cependant, à un stade plus avancé de la maladie, la prise de médicaments augmentant la sensibilité à l'insuline et améliorant le fonctionnement de la cellule β est requise. Lorsque ces agents deviennent inefficaces, l'injection d'insuline de synthèse devient nécessaire.

La plupart des cas DT2 sont causés par l'interaction entre certains gènes de susceptibilité (voir section 1.2.1) et une pression environnementale. Cependant, certaines formes de diabète de type 2 sont héréditaires et monogéniques. Ces formes de diabète sont causées par une mutation génétique entraînant une dysfonction de la cellule β pancréatique (*Greeley et al*, 2010; *Vaxillaire*, 2010). Les diabètes monogéniques néonataux et MODY (*maturity-onset of the young*) regroupent diverses mutations dans environ 20 gènes causant des retards de développement du pancréas (ex. *pancreatic and duodenal homeobox 1* (PDX1)), une diminution du 'sensing' du glucose et de son métabolisme (ex. glucokinase) ou une perte de dépolarisation de la membrane plasmique inhibant la sécrétion d'insuline (sous-unité du canal potassique ATP-dépendant) (*Bonnefond et al*, 2010). Cette forme monogénique de diabète est habituellement diagnostiquée peu de temps après la naissance, mais peut apparaître plus tard dans l'enfance.

Le troisième type de diabète, le diabète gestationnel, est un état temporaire survenant lors d'une grossesse. Il est causé par la diminution de la sensibilité à l'insuline se produisant lors d'une grossesse, mais face à laquelle le pancréas ne sécrète pas suffisamment d'insuline pour compenser. Le diabète gestationnel entraîne un risque accru de récurrence chez la mère lors d'une prochaine grossesse et augmente les probabilités de développer un DT2 chez la mère et l'enfant dans l'avenir (*Bottalico*, 2007).

1.2 Le diabète de type 2

Le DT2 est un désordre du métabolisme des nutriments causé d'une part par une insensibilité progressive des tissus périphériques à l'action de l'insuline (muscles, tissus adipeux, foie) et d'autre part, par l'incapacité de la cellule β du pancréas à compenser en sécrétant suffisamment d'insuline. Les individus qui développent le diabète ont dès le départ une prédisposition à la maladie. Ils sont porteurs d'un ensemble de gènes les rendant susceptibles à développer une résistance à l'insuline ou une dysfonction de la cellule β (*Prentki et Nolan, 2006*). Cependant, l'exposition à des facteurs environnementaux aggravants tels un surplus de nutriments et un manque d'activité physique contribue au développement graduel du diabète (*Arsov et al, 2006*). En effet, il existe une association très forte entre l'obésité, mesurée par la circonférence à la taille, et le développement du DT2 (*Freemantle et al, 2008*). La surcharge pondérale contribue à l'augmentation des niveaux circulants d'acides gras qui entraînent le développement de la résistance des tissus périphériques à l'action de l'insuline. D'ailleurs, plus de 70% des personnes souffrant de DT2 sont aussi obèses (*Kramer et al, 2010*).

1.2.1 Gènes de prédisposition au diabète de type 2

Le DT2 est une maladie multigénique avec une composante héréditaire évidente, où l'existence d'un parent proche atteint augmente les chances de développer la maladie de 2 à 6 fois (*Doria et al, 2008*). Le développement des technologies micropuce, de méthodes de séquençage à haut débit ainsi que l'identification de polymorphismes du génome humain (*single-nucléotide polymorphism, SNP*) ont permis les études pan-génomiques de type GWAS (*genome-wide association study*), qui mesurent le lien de causalité entre différents polymorphismes et le risque de développer le DT2 chez une population générale, dans des études de type cas-témoin. Un peu plus de 20 gènes de susceptibilité au DT2 ont ainsi été identifiés jusqu'à maintenant (*Vaxillaire, 2010*).

Tableau 2 : Quelques gènes dont les polymorphismes sont associés à une perte de fonction de la cellule β et au développement du DT2

Gènes	Fonction
TCF7L2	Facteur de transcription de la voie de Wnt
SLC30A8	Transporteur de zinc des granules d'insuline (ZNT8)
Kir6.2	Sous-unité régulatrice du canal potassique ATP-dépendant
IDE	<i>Insulin degrading enzyme</i>
HHEX	<i>Hematopoietically-expressed homeobox protein</i> (impliqué dans le développement du pancréas)
PPAR γ	Facteur de transcription régulant le stockage des lipides

Confirmé par plusieurs études, des polymorphismes du gène transcription factor 7-like 2 (TCF7L2) représente le facteur de risque génétique le plus élevé pour le développement du DT2. TCF7L2 est un facteur de transcription de la voie de signalisation Wnt. Son activation mène à l'inhibition de la synthèse du pro-glucagon dans les cellules endocrines de l'intestin (*Jin et Liu, 2008*). Des études *in vitro* et cliniques confirment que l'augmentation du risque de développer le DT2 par l'expression du variant de TCF7L2 serait dû à un défaut de sécrétion d'insuline par la cellule β (*da Silva Xavier et al, 2012; Le Bacquer et al, 2012*). Un autre gène de susceptibilité est le *solute carrier family 30 (zinc transporter), member 8* (SLC30A8), codant pour le transporteur au zinc ZnT8 (*zinc transporter 8*) (*Sladek et al, 2007*). Ce transporteur est présent uniquement dans les granules de sécrétion des cellules β et transporte les molécules de zinc importantes pour la formation d'hexamer de pro-insuline (la forme inactive et stable de l'insuline) à l'intérieur des granules. Une augmentation d'expression de ZnT8 est associée à une augmentation de

la sécrétion d'insuline, et donc sa mutation peut conduire à un défaut de sécrétion (*Chimienti et al*, 2006). La majorité des gènes ayant été identifiés sont importants pour la fonction de la cellule β , dont la sous-unité régulatrice Kir6.2 (*potassium inwardly-rectifying channel 6.2*) du canal potassique ATP-dépendant (K^{ATP}), *insulin degrading enzyme* (IDE) dont la dysfonction entraîne l'accumulation de dépôts d'amyloïdes (protéine pancréatique présente chez l'homme dont l'accumulation et la condensation est observée dans les cellules β des patients diabétiques et causerait la dysfonction et la mort de ces cellules) et *hematopoietically-expressed homeobox protein* (HHEX), un gène important dans le développement du pancréas (*Sladek et al*, 2007). Certains autres gènes sont impliqués dans la résistance à l'insuline comme le facteur de transcription *peroxisome proliferator-activated receptor γ* (PPAR γ) et l'*ectophosphodiesterase/nucleotide phosphohydrolase protein* (ENPP), une glycoprotéine transmembranaire inhibitrice du récepteur à l'insuline (*Sladek et al*, 2007; *Vaxillaire*, 2010), et le gène codant pour l'*insulin-receptor substrate 1* (IRS1), une protéine associée au récepteur à l'insuline (*Voight et al*, 2010). La présence de plusieurs polymorphismes permet d'ailleurs de prédire avec plus de précision le développement ultérieur du DT2 qu'un seul polymorphisme. Néanmoins, l'ensemble des gènes liés au DT2 récemment découvert n'expliquent pas plus que 10% de la susceptibilité génétique liée à cette maladie. Il se pourrait que des variants rares mais avec une pénétration plus grande expliquent la variation génétique résiduelle ou que celle-ci soit due tout au moins en partie à des changements épigénétiques (*Nolan et al*, 2011). La connaissance des différents polymorphismes en plus des facteurs de risques cliniques pourraient permettre de mieux comprendre et prévenir la maladie.

1.2.2 La résistance à l'insuline

L'insuline stimule la captation du glucose dans les tissus cibles tels les muscles squelettiques, le foie, ou le tissu adipeux (*Leahy*, 2005). La résistance à l'insuline se définit donc comme étant une diminution *in vivo* de la capacité de l'insuline à provoquer la

captation du glucose. Elle s'installe de façon précoce, alors que la glycémie est encore normale.

Les muscles squelettiques assurent environ 75 % de la clairance du glucose (*Klip et Paquet, 1990*). L'insuline, une fois sécrétée dans la circulation sanguine, se lie à son récepteur à la surface des myocytes. La liaison au récepteur entraîne l'activation et le recrutement d'un cofacteur, l'IRS1. L'activation d'IRS1 enclenche une cascade signalétique ayant pour conséquence la translocation du transporteur du glucose, GLUT4 (*glucose transporter 4*), à la membrane plasmique, l'entrée du glucose dans le muscle et l'abaissement de la glycémie. Le glucose est alors métabolisé d'une part en glycogène par le muscle afin d'emmagasiner l'énergie dérivée du glucose, et d'autre part entre dans la voie glycolytique (*Shulman et al, 1990*). Les études chez les patients résistants à l'insuline, obèses ayant une tolérance normale au glucose (*normal glucose tolerance*, NGT) ou diabétiques, ont démontré que la résistance à l'insuline est en partie causée par une diminution de l'activation de l'IRS1 par le récepteur de l'insuline (*Cusi et al, 2000; Pratipanawatr et al, 2001*). Cette diminution est causée par la phosphorylation de résidus Ser de l'IRS1. Il s'ensuit une diminution de la translocation de GLUT4 à la membrane et de la captation du glucose, ce qui contribue à augmenter la glycémie et diminuer la capacité des myocytes à emmagasiner l'énergie sous forme de glycogène. La présence de GLUT4 à la membrane plasmique des cellules musculaires est essentielle pour assurer une sensibilité adéquate à l'insuline, car l'invalidation génétique de ce transporteur dans le muscle entraîne une intolérance sévère au glucose (*Zisman et al, 2000*).

Le tissu adipeux a pour rôle d'emmagasiner l'excès de nutriments sous la forme d'un lipide neutre : le triacylglycérol (TG) sous la forme de gouttelettes lipidiques (*Guilherme et al, 2008*). Ces lipides peuvent ensuite être hydrolysés en période de jeûne pour répondre aux besoins énergétiques du corps. Les adipocytes possèdent le même transporteur de glucose que les muscles, GLUT4, et sa translocation à la membrane par l'action de l'insuline est régulée de façon similaire. La stimulation des adipocytes par l'insuline accroît la synthèse des lipides en augmentant la captation du glucose et

l'activation de gènes clés de cette voie métabolique (tel que la pyruvate déshydrogénase (PDH), l'acétyl-CoA carboxylase (ACC) et la *fatty acid* synthétase (FAS)) (Belsham *et al*, 1980). L'insuline inhibe aussi l'hydrolyse des lipides (lipolyse) en diminuant l'activité de certaines lipases dont HSL (*hormone-sensitive lipase*) (Anthonsen *et al*, 1998). L'insuline induit donc un stockage du glucose sous forme de graisses.

Une autre fonction du tissu adipeux est de sécréter différentes hormones (adipokines), telles que la leptine, la résistine et l'adiponectine, ainsi que des molécules pro-inflammatoires dont *monocyte chemotactic protein-1* (MCP-1) et l'interleukine 6 (IL-6) afin de réguler l'appétit, la dépense énergétique et la résistance à l'insuline (Kershaw *et Flier*, 2004). Au fur et à la mesure que l'adiposité augmente, la capacité endocrinienne des tissus adipeux change. En effet, chez les sujets obèses insulino-résistants, on observe une diminution de l'expression de l'adiponectine (hormone associée à une augmentation de la sensibilité à l'insuline) (Bays *et al*, 2008) et une augmentation de la sécrétion de la molécule chimioattractante MCP-1 (Sartipy *et Loskutoff*, 2003). Ceci entraîne le recrutement de cellules du système immunitaire, dont les macrophages, qui sécrètent la molécule pro-inflammatoire *tumor-necrosis factor α* (TNF α) dans le tissu adipeux (Hotamisligil *et al*, 1995). Cette molécule augmente la lipolyse et diminue la lipogénèse, provoquant une augmentation de la concentration d'acides gras en circulation. Ces concentrations accrues d'acides gras ont des répercussions directes sur les autres tissus en stimulant la gluconéogenèse dans le foie (Williamson *et al*, 1966; Bevilacqua *et al*, 1987) et en inhibant la captation du glucose dans le foie et les muscles (Bajaj *et al*, 2002), contribuant ainsi à l'augmentation de la glycémie. De plus, la molécule TNF α serait un inhibiteur de la signalisation de la voie de l'insuline (Hotamisligil *et al*, 1996), contribuant à l'insulinorésistance du tissu adipeux et des muscles.

Le foie est un autre organe insulinosensible très important pour l'homéostasie systémique énergétique, en particulier par sa contribution à l'homéostasie du glucose et des acides gras. Lors d'un jeûne, les besoins du cerveau en glucose sont comblés majoritairement par la gluconéogenèse du foie. Au contraire, lorsque les nutriments

abondent, le foie peut entreposer le glucose sous forme de glycogène ou de lipides. Chez les rongeurs, le foie, tout comme la cellule β pancréatique, exprime le transporteur de glucose 2 (GLUT2) ayant une grande capacité à transporter le glucose (en raison de sa petite affinité pour ce substrat) et dont l'expression n'est pas régulée par l'insuline (*Girard et al*, 1992). Ceci permet aux concentrations intrahépatiques de refléter les concentrations plasmatiques.

L'insuline module plusieurs mécanismes hépatiques. Tout d'abord, elle inhibe la production de glucose par le foie de deux façons : en diminuant la glycogénolyse (métabolisme du glycogène en glucose) par sa modulation de l'expression de gènes du métabolisme du glycogène (*Leclercq et al*, 2007) et en diminuant la gluconéogenèse (synthèse *de novo* de glucose) par l'inhibition de l'enzyme limitante, la phosphoenolpyruvate carboxykinase (PEPCK) (*Sutherland et al*, 1996). De plus, l'insuline régule le métabolisme des acides gras par le foie en inhibant la synthèse des lipoprotéines VLDL (*very low-density lipoprotein*) en augmentant la dégradation de la protéine ApoB et en augmentant la lipogenèse *de novo* (*Meshkani et Adeli*, 2009).

L'action de l'insuline sur les hépatocytes est à la fois directe (par la liaison à son récepteur à la surface des hépatocytes) (*Michael et al*, 2000) mais aussi indirecte, par la modulation des concentrations de glucose et d'acides gras plasmatiques (par son action sur les autres tissus insulinosensibles) (*Bergman et Ader*, 2000). La résistance à l'insuline du foie a donc des conséquences sévères sur la glycémie en entraînant une diminution de l'inhibition de la gluconéogenèse du foie par l'insuline (*Magnusson et al*, 1992), et une augmentation de la glycogénolyse (*Meshkani et Adeli*, 2009). La résistance à l'insuline contribue également à la dyslipidémie en causant d'une part une augmentation de la concentration d'acides gras libres en circulation provenant du tissu adipeux qui agissent comme substrat pour la synthèse de VLDL (*Adiels et al*, 2008) et d'autre part, en induisant une augmentation de la synthèse hépatique des VLDL (*Meshkani et Adeli*, 2009). Ceci entraîne une hausse de la concentration de TG intra-hépatique et des VLDL en circulation.

1.2.3 Compensation et dysfonction de la cellule β

Dans un premier temps, la résistance des tissus périphériques à l'insuline induit une phase compensatoire où la masse des cellules β et leur fonction augmentent afin de produire et de sécréter davantage d'insuline pour compenser cette résistance (*Prentki et Nolan, 2006*). On assiste alors à une hyperinsulinémie mais la glycémie reste dans des valeurs normales. L'abondance de nutriments circulants qui caractérise l'obésité contribue à une augmentation de la sécrétion d'insuline par la cellule β . Chez un individu ayant un poids normal, l'élévation de la glycémie induit l'augmentation de l'activité de l'enzyme glucokinase (*Chen et al, 1994a; Chen et al, 1994b*) et du métabolisme du glucose (*Chen et al, 1994b; Liu et al, 2002*), contribuant ainsi à l'élévation de la sécrétion. Chez un individu obèse, les concentrations d'acides gras et triglycérides circulants élevées permettent d'une part l'activation accrue du récepteur couplé aux protéines G 40 (GPR40) et d'autre part, l'accroissement du métabolisme lipidique intracellulaire. Cet accroissement favorise la production de molécules signalétiques lipidiques (*Prentki et al, 1992; Roduit et al, 2004; Nolan et al, 2006*) conduisant à l'augmentation de la sécrétion d'insuline. D'autres facteurs contribuent aussi à amplifier la sécrétion d'insuline. Le *glucagon-like peptide 1* (GLP-1), une incrétine sécrétée par les cellules de l'intestin reconnue pour promouvoir la prolifération des cellules β et inhiber leur apoptose, agit aussi sur la cellule β pour accentuer la sécrétion (*Baggio et Drucker, 2006; Drucker, 2006*). Aussi, l'action autocrine de l'insuline et de l'*insulin-like growth factor 1* et 2 (IGF1 et IGF2) contribue à la prolifération et la survie de la cellule β par le biais de l'adaptateur au récepteur à l'insuline *insulin receptor substrate 2* (IRS2) et de la cascade signalétique de la protéine kinase B (PKB) (*Jetton et al, 2005*). Finalement, l'augmentation de la stimulation du pancréas par le système nerveux central parasympathique contribuerait à l'augmentation compensatoire de la sécrétion et de la croissance de la cellule β (*Kiba et al, 1996; Del Rio et al, 1997*).

La dysfonction de la cellule β caractérise l'apparition d'un diabète franc. La présence chronique et anormalement élevée de nutriments conduit à l'épuisement de la cellule β , à une diminution de la sécrétion d'insuline, à la dégranulation (diminution du

nombre et du contenu des granules de sécrétion d'insuline) de la cellule et à l'incapacité de relâcher l'insuline (Leahy, 2005). Les mécanismes sous-tendant la perte de fonction de la cellule β sont nombreux et complexes. Le stade précoce de dysfonction est caractérisé par la perte du patron oscillatoire de la sécrétion d'insuline (O'Rahilly *et al*, 1988; Schmitz *et al*, 1997) et par la diminution de la première phase de sécrétion (Perley *et Kipnis*, 1967). De plus, la diminution de la masse des cellules β est aussi un événement précoce impliqué dans la dysfonction et peut atteindre 40 % chez les sujets pré-diabétiques (Butler *et al*, 2003a). L'apoptose est la cause la plus probable de la diminution de la masse des cellules β dans le DT2. Elle serait causée par le stress du réticulum endoplasmique, le stress oxydatif et la glucolipotoxicité. La compréhension des mécanismes soutenant ces stress sont encore mal connus et à l'étude (Leahy, 2005; Prentki *et Nolan*, 2006).

Les conséquences néfastes de concentrations chroniquement élevées de glucose ou d'acides gras pour la cellule β sont connues sous les noms respectifs de glucotoxicité et lipotoxicité. Les travaux du groupe Bonner-Weir indiquent que la glucotoxicité cause des changements dans l'expression des gènes de la cellule β , conduisant à la dédifférenciation des cellules (Laybutt *et al*, 2003). La lipotoxicité inhibe l'expression du gène de l'insuline et cause l'accumulation de lipides complexes toxiques comme les céramides (Leahy, 2005). Cependant, les travaux plus récents de notre laboratoire suggèrent que les concepts de gluco- et lipotoxicité sont probablement inter-reliés (El-Assaad *et al*, 2003; Prentki *et Nolan*, 2006; El-Assaad, 2010). En effet, la courte exposition (< 24 h) à une concentration élevée de glucose (20 mM) ou d'acide gras (0,4 mM palmitate) n'induit pas l'apoptose dans les îlots de rongeur ou humains (El-Assaad *et al*, 2003; Buteau *et al*, 2004). En fait, l'hyperlipidémie, en absence d'hyperglycémie, ne semble pas être toxique pour la cellule β du moins à court terme, et au contraire contribuerait à l'adaptation de celle-ci à une résistance à l'insuline grandissante, concept appelé lipo-adaptation (Nolan *et al*, 2006; Prentki *et Nolan*, 2006). Ce serait plutôt la présence conjointe de glucose et d'acides gras en forte concentration qui deviendrait rapidement toxique pour la cellule β . Nous parlons alors de « glucolipotoxicité » (Prentki *et Corkey*, 1996; El-Assaad *et al*, 2003).

Les conséquences de la glucolipotoxicité sont associées à des mécanismes moléculaires néfastes pour la cellule β (par exemple, un statut inflammatoire dans l'îlot), à l'O-glycosylation d'acides aminés, au stress du réticulum endoplasmique et à la dysfonction mitochondriale (*van Raalte et Diamant, 2011*). De plus, le métabolisme accru du glucose cause l'augmentation de la concentration d'adénosine triphosphate (ATP), ayant pour conséquence l'inhibition d'une kinase importante sensible aux changements du statut énergétique cellulaire, la protéine kinase activée par l'adénosine monophosphate (AMPK), diminuant l'oxydation des acides gras et donc leur détoxification. Les acides gras sont alors redirigés vers le cycle TG/AG (triglycérides / acides gras libres) générant ainsi plusieurs facteurs de couplage métaboliques tels que les diacylglycérols (DAG) et monoacylglycérols (MAG) qui amplifieront la sécrétion d'insuline à court terme. Par contre, la présence chronique de ces nutriments calorigéniques permettra la synthèse en lipides plus complexes dont certains, comme les céramides, sont toxiques pour la cellule. D'ailleurs, l'augmentation de la concentration de TG dans la cellule β (stéatose) est associée avec une diminution de l'expression du gène de l'insuline (*Briaud et al, 2001*) et de sa sécrétion (*Stefan et al, 2003*). Aussi, la présence de concentrations élevées d'acides gras (AG) contribue à la déposition de fibrilles d'amyloïde dans les cellules de l'îlot (*Hull et al, 2003*). Cet effet est accentué en présence de hautes concentrations de glucose (*Hoppener et al, 2008*). Ces dépôts d'amyloïdes, tout comme dans la maladie d'Alzheimer, contribueraient à la destruction de la cellule β et à la réduction de sa masse (*Opie, 1901; Butler et al, 2003b*).

1.2.4 Stades de développement du diabète de type 2

Le critère principal de classification des stades de développement du DT2 chez l'humain est lié à la mesure de la glycémie suite à un test de tolérance au glucose (*oral glucose tolerance test, OGTT*). Le stade le plus précoce dans l'histoire naturelle du DT2 est caractérisé par une tolérance normale au glucose (*normal glucose tolerance, NGT* - Figure 3). À cette étape, chez un sujet non-diabétique non obèse, la glycémie à jeun ou 2 h

après l'ingestion de 75 g de glucose (test d'hyperglycémie provoquée) est maintenue en-dessous de 7,0 mM (CDA, 2008). De plus, la sensibilité à l'insuline est normale. Chez certains sujets obèses, l'élévation des concentrations circulantes d'acides gras entraîne une diminution de la sensibilité à l'insuline. Cette diminution est compensée par une augmentation de la sécrétion d'insuline par la cellule β . Ces sujets obèses réussissent donc à maintenir une glycémie normale.

Le passage du stade NGT à celui de l'intolérance au glucose (*impaired glucose tolerance*, IGT) est marqué par une diminution de la sensibilité à l'insuline et d'une augmentation compensatoire, mais insuffisante, de la sécrétion d'insuline lors du test d'hyperglycémie provoquée. La glycémie à jeun reste en-dessous de 7,0 mM à ce stade, mais la glycémie prise 2 h après l'ingestion de 75 g de glucose est élevée (entre 7,8 et 11,1 mM) (Nolan *et al*, 2011). Le sujet IGT démontre une diminution de 60 % de la sensibilité à l'insuline (DeFronzo, 2009) ainsi qu'une diminution de 40 % du volume des cellules β (Leahy, 2005).

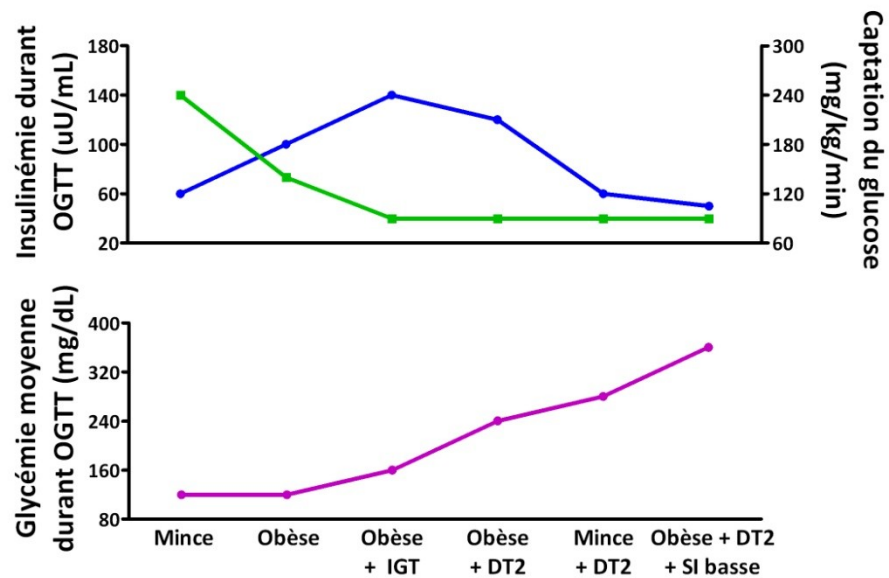


Figure 3. Histoire naturelle du diabète de type 2

Les divers paramètres mesurés lors d'un OGTT nous informent sur la progression du DT2. En vert, la sensibilité à l'insuline mesurée par la captation du glucose; en bleu, l'insuline plasmatique durant l'OGTT, indicateur de la sécrétion d'insuline; en mauve, la glycémie durant l'OGTT. SI : sécrétion d'insuline. Adapté de (DeFronzo, 1988).

La progression de l'IGT vers le DT2 est causée par l'incapacité de la cellule β à soutenir les niveaux compensatoires de sécrétion d'insuline. À ce stade, la résistance à l'insuline est déjà maximale (Leahy, 2005) et la diminution de la sécrétion d'insuline entraîne une augmentation de la glycémie. Alors que la résistance à l'insuline est une composante importante du développement du diabète, la perte de masse et de fonction des cellules β sont reconnus comme des facteurs déterminants de la maladie. (Leahy, 2005). Chez un patient obèse IGT, la fonction de la cellule β est diminuée d'environ 40% (Leahy, 2005), et au moment du diagnostic du DT2, on observe en moyenne une perte de masse des cellules β de 50 % (Butler et al, 2003a). De plus, la perte de fonction des cellules β est reconnue comme l'élément clé de la progression d'un stade IGT vers le développement d'un diabète franc (Leahy, 2005).

En conclusion, une diminution de l'action de l'insuline sur les tissus périphériques, en plus d'une incapacité de la cellule à sécréter des niveaux adéquats d'insuline, entraînent l'augmentation de la glycémie et le développement du DT2.

1.3 Les différents modèles animaux de diabète

Le diabète est une maladie complexe et la compréhension de ses causes implique l'utilisation de plusieurs modèles en recherche. Les modèles *in vitro* de culture cellulaire sont très utiles afin de disséquer les voies moléculaires impliquées, mais présentent des limitations évidentes, particulièrement en ce qui a trait à la généralisation des observations à un modèle plus complexe qu'est l'humain. L'obtention de tissus provenant de patients diabétiques est un atout précieux, mais limite l'étendue des études principalement à cause de la rareté du matériel biologique disponible. C'est pourquoi plusieurs modèles ont été développés chez les rongeurs, s'approchant de la physiologie humaine et permettant une grande diversité d'intervention ainsi que l'accès à une quantité plus grande de tissus. Cependant, le métabolisme, entre autres des lipides, étant différent d'une espèce à l'autre (Terpstra, 2001; Bergen et Mersmann, 2005), les études réalisées chez les rongeurs se doivent d'être confirmées chez l'homme.

Il existe trois principaux types de modèles animaux pour l'étude du DT2 : les modèles génétiques, nutritionnels et chimiquement induits. Tout d'abord, explorons certains modèles monogéniques d'obésité et de diabète. Les rats *Zucker fatty* (ZF) et *Zucker Diabetic Fatty* (ZDF) sont issus d'une lignée de rats Zucker du laboratoire du Dr Walter N. Shaw (Indianapolis, IN, USA) (Larsson et al, 1977; Clark et al, 1983). Les rats ZF possède une mutation inactivatrice du récepteur à la leptine. Ces animaux sont hyperphagiques, obèses et hyperinsulinémiques, mais demeurent normoglycémiques (Bray, 1977). Ils sont particulièrement utilisés pour des études portant sur l'obésité, l'insulinorésistance et l'hypertension. Les rats ZDF sont dérivés de la lignée ZF suite à une

mutation spontanée du promoteur de l'insuline qui les rend diabétiques (*Griffen et al*, 2001). Ce modèle est très utilisé dans l'étude des phases de développement du DT2. Les rats ZDF sont légèrement hyperglycémiques et pré-diabétiques à l'âge de 7-8 semaines, et deviennent diabétiques à 10-12 semaines en raison d'une perte de fonction des cellules β pancréatiques à cet âge. D'autres modèles génétiques de DT2 sont les souris ob/ob et db/db. Les souris ob/ob possèdent une mutation inactivatrice du gène de la leptine alors que les souris db/db possèdent une mutation inactivatrice du récepteur à la leptine. À la fois les souris ob/ob et db/db deviennent obèses et diabétiques, mais les souris ob/ob développent une hyperglycémie moins sévère que les db/db (*Chen et Wang*, 2005).

Les modèles nutritionnels de DT2 sont aussi grandement utilisés dans la littérature. L'administration d'une diète riche en gras, en sucrose ou d'une diète de type cafétéria à des animaux tels la souris C57BL/6 ou le rat Sprague-Dawley permet le développement graduel d'hyperglycémie et d'insulinorésistance, ce qui permet l'étude de différents stades de développement du DT2 (*Chen et Wang*, 2005). À l'encontre des modèles génétiques de DT2 qui sont dus à des mutations, les interventions nutritionnelles tel la souris DIO (*diet-induced obesity*) permettent des modifications métaboliques de tous les tissus et reflète davantage le syndrome métabolique présent chez les patients obèses et diabétiques.

Enfin, les modèles de diabète chimiquement induits, telle l'injection de la streptozotocine chez le rat ou la souris, sont des modèles plus drastiques impliquant la destruction des cellules β par un agent chimique. La streptozotocine est un agent alkylant ayant une structure très similaire au glucose. Elle est favorablement captée par les cellules exprimant le récepteur GLUT2 à leur membrane plasmique. Ainsi, la streptozotocine est très toxique pour la cellule β . Les modèles utilisant une dose élevée (autour de 180 mg/kg) de streptozotocine entraînent une destruction massive des cellules β et s'apparentent donc davantage au diabète de type 1 (*Arora*, 2009). Les modèles utilisant une dose faible de streptozotocine (de 30 à 100 mg/kg), accompagnée parfois d'une administration d'une diète riche en gras, s'apparente davantage au DT2 (*Chen et Wang*, 2005; *Zhang et al*, 2008).

Chapitre 2. Voies métaboliques impliquées dans le contrôle de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose et aux acides gras libres

2.1 Le métabolisme oxydatif du glucose

Chez les rongeurs, le glucose entre dans la cellule β par le transporteur GLUT2. C'est un transporteur de grande capacité pour le glucose soit bien supérieure à la capacité de la glucokinase à le phosphoryler (*Matschinsky et al*, 1993). Ainsi, les concentrations intracellulaires de glucose reflètent les concentrations plasmatiques (*Thorens et al*, 1988). Il est par la suite métabolisé par les enzymes de la glycolyse et du cycle de Krebs, afin de produire du dioxyde de carbone (CO_2) et de l'ATP.

2.1.1 La glycolyse

La glycolyse est la voie métabolique au cours de laquelle le glucose est métabolisé en pyruvate (voir figure 4). Suite à son entrée dans la cellule, le glucose est rapidement phosphorylé en glucose-6-phosphate par les hexokinases. La cellule β exprime deux isoformes de cette enzyme : l'hexokinase 1 et l'hexokinase 4 (aussi connue sous le nom de glucokinase) (*Matschinsky et Ellerman*, 1968; *Shimizu et al*, 1988). L'hexokinase 1, qui a un K_m très petit pour le glucose, se trouve rapidement saturée et catalyse la production d'une toute petite fraction du glucose-6-phosphate dans la cellule β . En contrepartie, la glucokinase a un K_m élevé pour le glucose et n'est pas inhibée par le produit de sa réaction (le glucose-6 phosphate). Ceci lui permet d'agir à des concentrations de glucose très variables (basses ou hautes) sans être saturé (*Matschinsky et Ellerman*, 1968) et elle est donc l'isoforme hexokinase principale de la cellule β . La phosphorylation du glucose est l'étape limitante de la glycolyse de la cellule β et la glucokinase est donc considérée comme le « senseur » de glucose de cette cellule. Une mutation de la glucokinase est

d'ailleurs impliquée dans les diabètes de type MODY (*Murphy et al*, 2008), ce qui démontre l'importance de sa bonne fonction pour une sécrétion d'insuline normale.

Une autre étape importante de la glycolyse est la production du fructose-1,6-bisphosphate à partir du fructose-6-phosphate par l'enzyme phosphofructokinase (PFK). Il existe trois isoformes de cette enzyme : PKF-L (isoforme du foie), PKF-C (isoforme de type C) et PFK-M (isoforme du muscle). La cellule β exprime principalement la PFK-M qui, dans les cellules musculaires et chez la levure, est la source d'oscillations dans le flux glycolytique (*Goldbeter et Caplan*, 1976; *Hess*, 1997). Dans la cellule β , plusieurs paramètres métaboliques suivent une tendance oscillatoire : la sécrétion d'insuline, les niveaux de calcium cytosoliques, le ratio ATP/ADP, les niveaux de glucose-6-phosphate (*Lang et al*, 1979; *Nilsson et al*, 1996; *Deeney et al*, 2001) et la consommation d'oxygène (*Porterfield et al*, 2000). De plus, ces oscillations sont perdues chez les patients atteints de DT2 (*Polonsky et al*, 1988). Des études récentes ont démontré que la source première de ces oscillations dans la cellule β serait comme dans le muscle, l'activité de la PFK-M (*Richard et al*, 2007).

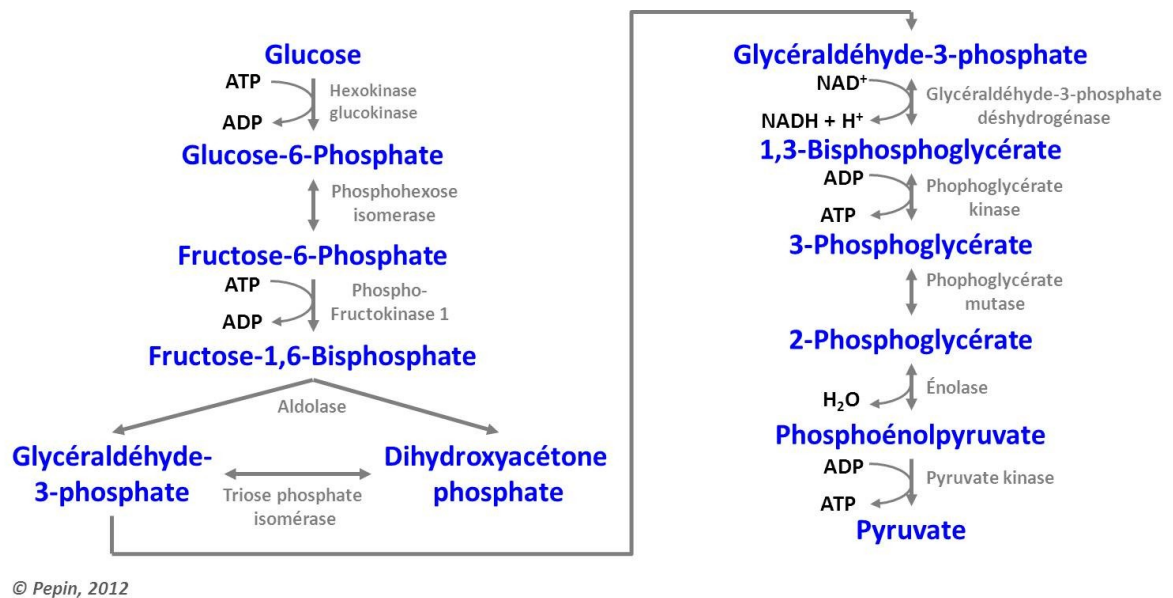


Figure 4. Voie métabolique de la glycolyse

Voie métabolique cytoplasmique catalysant la transformation du glucose en pyruvate. Adapté du manuel de biochimie *Voet and Voet* (*Voet et Voet*, 1995).

Les réactions subséquentes de la glycolyse permettent la production de deux molécules formées de trois carbones chacune : le glyceraldéhyde-3-phosphate (GAP) et le dihydroxyacétone phosphate (DHAP). La molécule GAP sera métabolisée par le reste des enzymes de la glycolyse pour produire une molécule de pyruvate. Quant à lui, le DHAP peut être métabolisé de deux façons. Premièrement, son isomérisation en GAP par l'enzyme triose phosphate isomérase peut donner naissance à une molécule additionnelle de pyruvate. Deuxièmement, le DHAP peut aussi être transformé par l'enzyme glycérol-phosphate déshydrogénase pour produire le glycérol-3-phosphate (Gly3P), le substrat essentiel à la synthèse de lipides complexes (*Prentki et Madiraju*, 2008). Le pyruvate produit par la glycolyse est ensuite oxydé par le cycle des acides tricarboxyliques (TCA, *tricarboxylic acid cycle*) dans la mitochondrie. En effet, comme la cellule β exprime l'enzyme lactate déshydrogénase (qui catalyse la transformation du pyruvate en lactate) à des niveaux 100x inférieurs en comparaison aux autres types cellulaires (*Sekine et al*,

1994), c'est la quasi-totalité du pyruvate qui entrera dans le cycle de Krebs (*Schuit et al*, 1997). Ceci permet une utilisation maximale du glucose pour la production de facteurs de couplage métaboliques potentialisateurs de la sécrétion d'insuline. Nous aborderons à la section 2.1.3 le concept de facteur de couplage métabolique (FCM) et leurs implications dans la biologie de la cellule β . Finalement, le rendement énergétique net de la glycolyse est la production de deux molécules d'ATP et deux molécules de $\text{NADH} + \text{H}^+$ qui fourniront des électrons à la chaîne respiratoire mitochondriale (*Voet et Voet*, 1995). Notez que la cellule β exprime peu la lactate déshydrogénase (*Sekine et al*, 1994), que la voie des pentose est faible par rapport à la glycolyse (*Schuit et al*, 1997) et qu'enfin elle n'exprime pas les enzymes-clés permettant la gluconéogenèse (*MacDonald et al*, 1992). Ainsi, dans la cellule β , le métabolisme du glucose est donc centré sur la glycolyse, ce qui permet ainsi un lien direct entre les niveaux de glucose, de pyruvate et des facteurs de couplage métaboliques dérivés de la mitochondrie ou de l'estérification du glycérol-3 phosphate (voir plus bas), nécessaires à la sécrétion d'insuline.

2.1.2 Le cycle des acides tricarboxyliques (TCA) ou cycle de Krebs

Le cycle TCA est un carrefour du métabolisme des glucides, des acides gras et des acides aminés (voir figure 5). En ce qui a trait au métabolisme du glucose, il catalyse la dégradation oxydative du pyruvate provenant de la glycolyse. Le pyruvate entre dans la mitochondrie par un système symport pyruvate- H^+ . Il est ensuite métabolisé par le complexe multi-enzyme PDH qui comprend trois activités enzymatiques différentes : l'activité pyruvate déshydrogénase, l'activité dihydrolipoyl transacétylase et l'activité dihydrolipoyl déshydrogénase. Il catalyse la production d'une molécule d'acétyl-CoA et de NADH (*Voet et Voet*, 1995). Par la suite, une succession de huit enzymes catalyse la production de deux molécules de CO_2 , une d'ATP ou de GTP, trois de NADH et une de FADH_2 . Le NADH et le FADH_2 sont des cofacteurs réducteurs qui donneront leurs électrons à la chaîne respiratoire afin de produire de l'ATP.

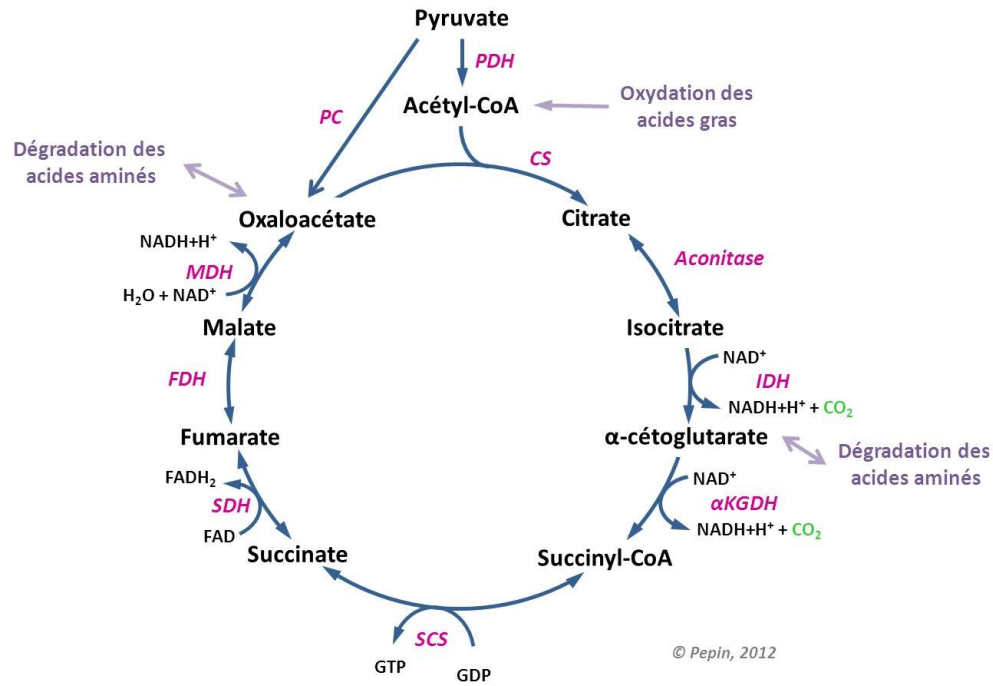


Figure 5. Cycle des acides tricarboxyliques (TCA)

Le pyruvate provenant de la glycolyse est métabolisé dans la mitochondrie par le cycle TCA, une succession de huit enzymes permettant la production de CO_2 , de $\text{NADH} + \text{H}^+$ et de FADH_2 . Le métabolisme des acides aminés et des acides gras peut aussi fournir des intermédiaires au cycle qui ultimement permettent la synthèse d'ATP. PC: pyruvate carboxylase; CS: citrate synthétase; IDH: isocitrate déshydrogénase; α KGDH: α -cétoglutarate déshydrogénase; SCS: succinyl-CoA synthétase; SDH: succinate déshydrogénase; FDH: fumarate déshydrogénase; MDH: malate déshydrogénase. Adapté du manuel de biochimie *Voet and Voet* (Voet et Voet, 1995).

Tel que décrit en détails à la prochaine section, la source d'acétyl-CoA peut provenir du pyruvate provenant de la glycolyse mais aussi de l'oxydation des acides gras. De plus, le métabolisme des acides aminés permet la production d'intermédiaires du cycle

TCA, comme le pyruvate, l' α -cétoglutarate (α KG), le succinyl-CoA et le fumarate, participant à l'anaplérose (ensemble des réactions génératrices d'intermédiaires du cycle TCA). L'activité des enzymes du cycle de Krebs est régulée de trois façons : selon la disponibilité de leur substrat, par la rétro-inhibition de leur produit ou par la rétro-inhibition compétitive d'intermédiaires générés plus loin au cours du cycle comme par exemple le citrate qui inhibe l'enzyme CS. Le flux à travers le cycle est aussi régulé en fonction de la capacité respiratoire de la chaîne de transport des électrons (CTE).

2.1.3 L'anaplérose et la cataplérose

En situation d'abondance de glucose, l'anaplérose et la cataplérose (ensemble des réactions utilisant des intermédiaires du cycle TCA pour générer d'autres métabolites) affectent les niveaux d'intermédiaires du cycle TCA. L'anaplérose permet l'entrée du pyruvate par des voies alternatives à la PDH, augmentant ainsi les niveaux d'intermédiaires du cycle. Par contre, pour assurer un flux optimal du cycle, certains intermédiaires doivent quitter la mitochondrie (cataplérose) et peuvent promouvoir d'autres voies métaboliques cytoplasmiques.

De façon alternative à sa transformation par l'enzyme PDH, le pyruvate peut rehausser les niveaux d'intermédiaires du cycle TCA en étant métabolisé par l'enzyme PC dont l'activité anaplérotique (activité de remplissage) produit de l'oxaloacétate. L'enzyme PC est habituellement fortement exprimée dans les tissus gluconéogéniques et lipogéniques (dont le foie et le tissu adipeux), mais son expression est aussi élevée dans la cellule β (Brun *et al*, 1996) où il n'y a pas de synthèse de glucose *de novo* et peu de lipogenèse (MacDonald *et al*, 1992). Près de 50% du pyruvate est métabolisé par la PC chez les rongeurs (MacDonald, 1993) et cette enzyme est très importante pour la sécrétion d'insuline en réponse au glucose. En effet, le métabolisme du pyruvate par la PC entraîne l'élévation des niveaux de citrate cytoplasmique, qui est associé à l'augmentation de la sécrétion d'insuline (Brun *et al*, 1996). De plus, des études de diminution d'expression de

PC ont démontré un lien direct entre la perte d'activité de l'enzyme et la diminution de la sécrétion d'insuline. Les mêmes études avec la PDH n'ont pas démontré un lien aussi direct (Xu *et al*, 2008a). L'expression de la PC est aussi diminuée chez les patients atteints de DT2 (MacDonald *et al*, 2009). Par contre, la PC serait 70% moins exprimée dans la cellule β humaine que chez les rongeurs (MacDonald *et al*, 2009; MacDonald *et al*, 2011), ainsi l'importance de l'anaplérose et de la PC dans la sécrétion d'insuline induite par le glucose chez l'humain reste à définir. D'autres réactions anaplérotiques comprennent la production de malate à partir du pyruvate via l'enzyme malique, d' α KG, de succinyl-CoA et de fumarate par le métabolisme des acides aminés, de même que la production d'oxaloacétate par le métabolisme du pyruvate et des acides aminés.

Les réactions cataplérotiques associées aux réactions anaplérotiques impliquent l'export vers le cytoplasme du citrate pour promouvoir la synthèse des acides gras par l'élévation du malonyl-CoA de même que l'export de l'oxaloacétate et de l' α KG pour la synthèse des acides aminés acide aspartique, asparagine, acide glutamique et glutamine (Figure 6). Ainsi, en conditions d'abondance de nutriment, le glucose peut-être dévié vers des voies alternatives de biosynthèse, tout en maintenant une production d'ATP régulée et adéquate.

Le mécanisme d'anaplérose/cataplérose permet la production de FCM qui assurent un couplage serré entre les concentrations de nutriment et la sécrétion d'insuline dans la cellule β . Les métabolites malonyl-CoA (Peyot *et al*, 2004; Prentki *et Nolan*, 2006), succinate (Fahien *et MacDonald*, 2002), glutamate (Maechler *et Wollheim*, 1999), NADPH (MacDonald, 1995; Ivarsson *et al*, 2005), peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Pi *et al*, 2007) et les molécules signalétiques lipidiques dérivées de la lipolyse tels les acides gras libres, les acides gras-CoA à chaîne longue et le diacylglycérol (Prentki *et Madiraju*, 2008) ont été identifiés comme FCM potentiels. Cependant, les mécanismes par lesquels ces différents facteurs amplifient la sécrétion d'insuline ne sont pas bien compris (Guay *et al*, 2007).

Quatre navettes différentes sous-tendent les mécanismes d'anaplérose/cataplérose. Leur activités permettent aux intermédiaires du cycle de Krebs d'être métabolisés afin d'entrer et de sortir de la mitochondrie. Ces navettes sont: 1- la navette malate/aspartate, 2- la navette pyruvate/citrate, 3- la navette pyruvate/malate et 4- la navette pyruvate/isocitrate/ α -cétoglutarate.

La navette malate/aspartate. La majorité du NADH de la cellule est produit par le métabolisme mitochondrial oxydatif des divers nutriments. Toutefois, une partie est générée dans le cytosol par la glycolyse. Dans la plupart des tissus, l'enzyme lactate déshydrogénase assure la ré-oxydation du NADH en nicotinamide adénine dinucléotides (NAD^+) pour ne pas limiter le flux à travers la glycolyse. Par contre, comme mentionné précédemment, l'activité de cette enzyme est très faible dans la cellule β des rongeurs (Sekine et al, 1994). La mitochondrie n'étant pas perméable au NADH, un système de navettes métabolique permet donc, par différentes réactions, de réintroduire les électrons du NADH cytoplasmique dans la mitochondrie où ils pourront participer à la génération d'ATP. C'est entre autres le rôle de la navette malate/aspartate (Figure 6). L'oxaloacétate généré par le cycle de Krebs est transformé en acide aspartique par transamination, et l'acide aspartique quitte la mitochondrie pour aller régénérer l'oxaloacétate dans le cytoplasme. Par l'activité de l'enzyme MDH, l'oxaloacétate est transformé en malate avec l'oxydation d'une molécule de NADH. Le malate peut alors retourner dans la mitochondrie, pour réintégrer le cycle TCA. Ainsi, les électrons du NADH cytoplasmique sont apportés à la mitochondrie où ils seront donnés à la chaîne respiratoire. Cette navette permet donc le couplage entre l'utilisation du glucose et la sécrétion d'insuline et sa dysfonction entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et les acides gras (Rubi et al, 2004; Bender et al, 2009; Casimir et al, 2009).

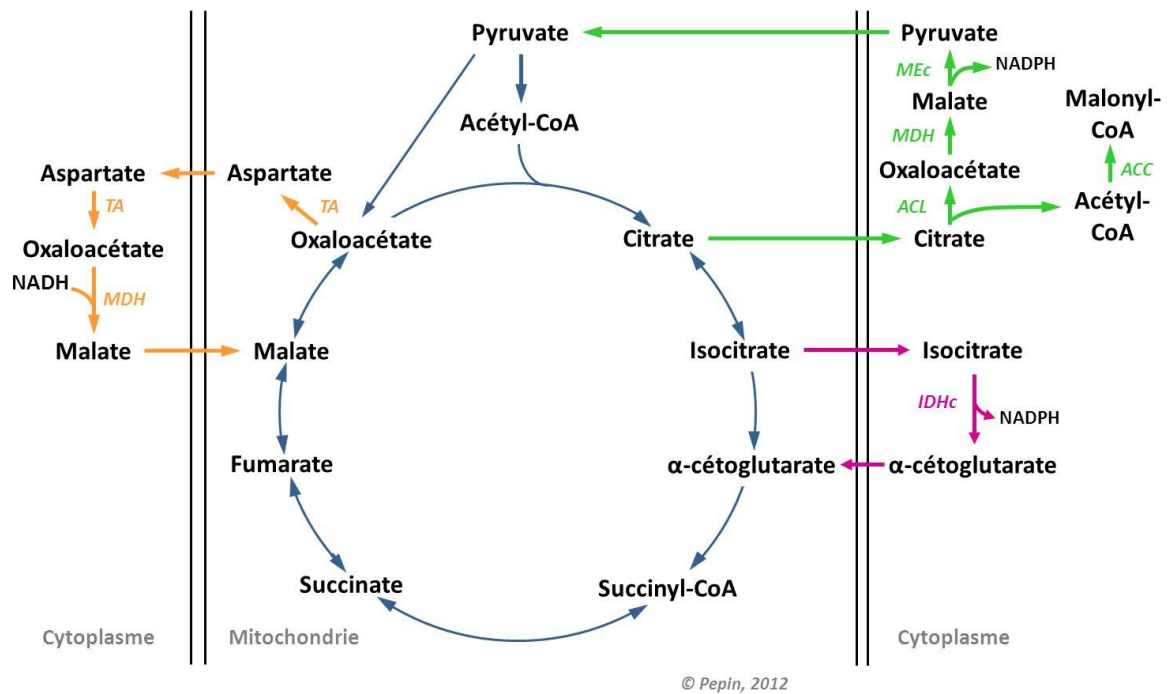


Figure 6. Les navettes anaplérotiques/cataplérotiques

Trois des quatre navettes anaplérotiques/cataplérotiques liés à la potentialisation de la sécrétion d'insuline. Les navettes pyruvate/citrate (en vert), isocitrate/ α KG (en mauve) et malate/aspartate (en orange) permettent la cataplérose d'intermédiaires du cycle de Krebs pour produire des facteurs de couplage métaboliques tels le NADPH et le malonyl-CoA, de même que le transfert de protons de la molécule NADH produit par la glycolyse, du cytoplasme vers la mitochondrie (navette malate/aspartate). ACL : ATP-citrate lyase; MEd : enzyme malique cytoplasmique; TA : transaminase. Tiré de Guay, C., *Thèse de doctorat*, Université de Montréal, 2008.

La navette pyruvate/citrate. Cette navette permet la sortie du citrate de la mitochondrie afin de générer le FCM malonyl-CoA, qui est important pour l'effet amplificateur du glucose et des acides gras sur la sécrétion d'insuline (voir Section 3.3). Le citrate est exporté de la mitochondrie et transformé par l'enzyme ACL en oxaloacétate et en acétyl-CoA. La molécule d'acétyl-CoA ainsi générée contribue à la formation du malonyl-CoA. Quant à la molécule d'oxaloacétate, elle est transformée en malate par la MDH (qui

utilise une molécule de NADH cytoplasmique) suivi de la production de pyruvate par MEc, générant un autre FCM, le NADPH. Le pyruvate retourne à la mitochondrie par le transporteur du pyruvate où il est métabolisé par le cycle de Krebs (*Farfari et al*, 2000). En résumé, cette navette permet la formation de deux FCM, le NADPH et le malonyl-CoA, ainsi que le transfert d'électrons d'une molécule de NADH provenant de la glycolyse, vers la mitochondrie, et la reoxydation du NAD dans le cytoplasme. Des études, dont une réalisée dans notre laboratoire, ont démontré l'importance de cette navette dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (*MacDonald et al*, 2003; *Guay et al*, 2007).

La navette pyruvate/malate. Cette navette implique la sortie du malate de la mitochondrie par le transporteur aux acides dicarboxyliques. MEc catalyse la formation du pyruvate en produisant une molécule de NADPH, tout comme dans la navette pyruvate/citrate. Le pyruvate alors produit retourne à la mitochondrie par le transporteur au pyruvate, où il entre dans le cycle de Krebs. Cette navette permet la production d'un FCM candidat (le NADPH), sans pourtant permettre le transfert d'électrons du NADH vers la mitochondrie et la réoxydation du NAD cytoplasmique. Par contre, l'activité de la navette semble être importante pour la sécrétion d'insuline par le glucose (*Pongratz et al*, 2007; *Xu et al*, 2008b).

La navette pyruvate/isocitrate/ α KG. Cette navette implique la sortie de l'isocitrate de la mitochondrie par le transporteur aux acides tricarboxyliques. Par la suite, l'enzyme isocitrate deshydrogénase catalyse la transformation de l'isocitrate en α KG avec la production d'une molécule de NADPH. Le α KG entre alors dans la mitochondrie par son transporteur où il est métabolisé par le cycle de Krebs. Cette navette entraîne donc la production d'une molécule de NADPH cytoplasmique mais son implication dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose est une question controversée (*Joseph et al*, 2006; *Ronnebaum et al*, 2006)(Guay, C., Prentki, M., résultats non-publiés).

2.1.4 La respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est assurée par la CTE et par l'enzyme ATP synthétase. La CTE assure l'oxydation des molécules de NADH et FADH₂ (générés par le cycle de Krebs, l'oxydation des acides gras et des acides aminés) alors que l'ATP synthétase utilise le gradient de protons créé par la CTE pour synthétiser l'ATP. La production d'ATP est donc catalysée par cinq complexes protéiques (complexe I, II, III, IV, et l'ATP synthétase), composés en tout de 90 sous-unités encodés en majorité par l'acide désoxyribonucléique (ADN) nucléaire, mais dont 13 sous-unités sont encodées par l'ADN mitochondrial. Les complexes sont situés dans la membrane interne mitochondriale, et possèdent des groupements réducteurs, formés entre autres d'atomes Fe et S et permettant le transfert des électrons. Ils agissent en combinaison avec les cofacteurs coenzyme-Q et cytochrome c (Figure 7). Tout d'abord, le complexe I assure l'oxydation du NADH par le coenzyme-Q et la translocation de protons (H⁺) vers l'espace inter-membranaire. Le complexe II est composé de l'enzyme SDH du cycle de Krebs, la seule enzyme membranaire du cycle, qui catalyse la production du fumarate et de FADH₂, dont les électrons sont donnés au coenzyme-Q. Par la suite, les électrons sont transférés via le complexe III qui assure le transfert des électrons du coenzyme-Q vers le cytochrome-C et la translocation de protons vers l'espace inter-membranaire. L'étape finale dans la CTE, catalysée par le complexe IV, est la consommation d'O₂ pour la production d'H₂O à l'aide de quatre électrons fournis par le cytochrome C et avec la translocation de protons vers l'espace inter-membranaire (*Voet et Voet*, 1995; *Nicholls et Ferguson*, 2002). Le taux de consommation d'oxygène par la mitochondrie est un bon indicateur du fonctionnement de la CTE.

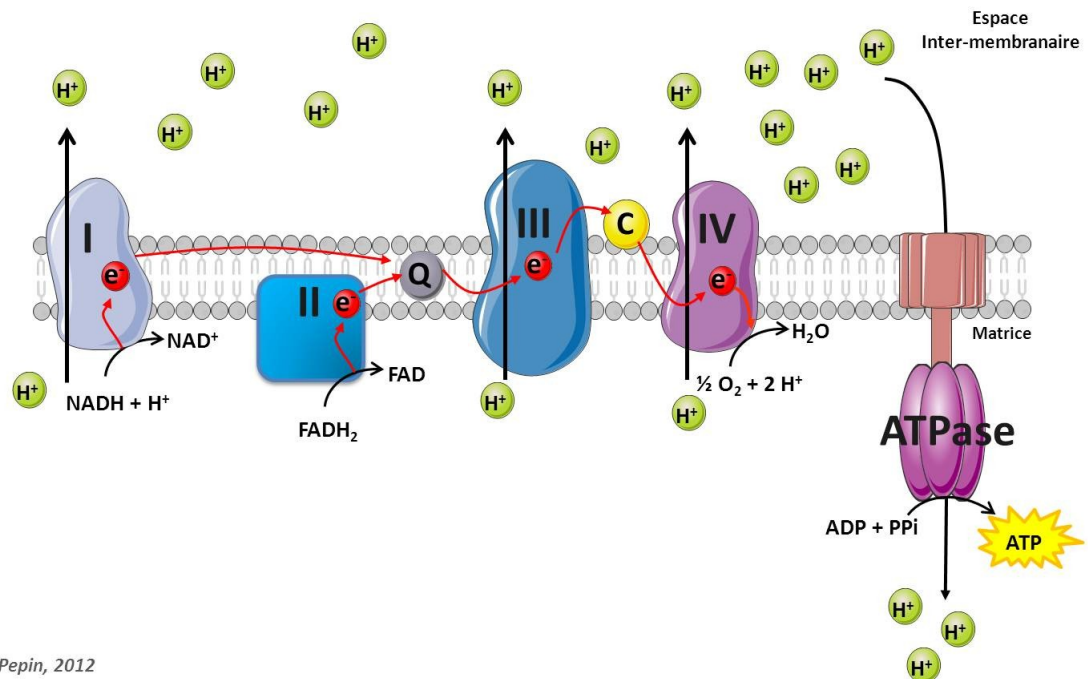


Figure 7. Chaîne de transport des électrons

La CTE est composée des complexes I, II, III et IV, ainsi que de l'ATP synthétase (ATPase) et des coenzymes Q (gris) et du cytochrome C (jaune). Le complexe I accepte les électrons du NADH. Le complexe II prend les électrons du FADH₂ provenant de l'enzyme SDH. Un gradient de proton se crée dans l'espace inter-membranaire, gradient qui est utilisé par l'enzyme ATP synthétase pour catalyser la synthèse d'ATP (Schéma réalisé à partir de Servier Medical Art, www.servier.fr/servier-medical-art).

Les complexes I, III et IV contribuent donc à la translocation de protons vers l'espace inter-membranaire, ce qui crée une différence de potentiel ($\Delta\psi_{\text{mito}}$) à travers la membrane interne de la mitochondrie. C'est ce $\Delta\psi_{\text{mito}}$ qu'utilise l'ATP synthétase afin de produire l'ATP. Ce complexe est la structure protéique la plus complexe de la mitochondrie. Ses deux sous-unités principales sont connues sous le nom de F₀ et F₁ ATPase. Elles utilisent l'énergie équivalente à la translocation d'environ trois protons vers l'espace inter-membranaire pour catalyser le changement de conformation du complexe, permettant la rotation des unités F₀ et F₁, la synthèse et le relâchement d'une molécule

d'ATP. Un bon couplage entre la CTE et la phosphorylation oxydative assure une production adéquate d'ATP en fonction des concentrations de nutriments. Ce couplage est dépendant de l'imperméabilité de la membrane interne mitochondriale, comme l'a démontré des études utilisant des molécules découplantes comme le carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP). Ces molécules découplantes s'insèrent dans la bicouche phospholipidique la rendant beaucoup plus perméable aux ions. Les ions pouvant traverser la membrane interne de la mitochondrie, ceci entraîne la dissipation du gradient de proton à travers la membrane, ce qui résulte en une réduction de la production d'ATP et d'une augmentation de la consommation d'oxygène (*Voet et Voet, 1995; Nicholls et Ferguson, 2002*).

Plusieurs études ont démontré un lien entre la CTE, la sécrétion d'insuline et le DT2. En effet, le traitement de souris à la streptozotocine (un agent alkylant spécifique et toxique pour les cellules β) afin d'induire un diabète sévère est associé à un défaut du complexe III de la chaîne (*Kristal et al, 1997*). De plus, la déplétion de l'ADN mitochondrial (codant pour certaines sous-unités de la chaîne) dans la cellule β entraîne une perte de sécrétion d'insuline (*Kennedy et al, 1996*). Enfin, certaines mutations inactivatrices de PGC1 α (un coactivateur transcriptionnel contrôlant l'expression de plusieurs protéines de la CTE) sont associées à une augmentation des risques de développer le DT2 (*Barroso et al, 2006*), et une diminution de l'expression de PGC1 α a été observée dans les îlots de patients DT2 (*Ling et al, 2008*).

2.2 Le métabolisme oxydatif des acides gras

Les acides gras sont des nutriments essentiels au bon fonctionnement de l'organisme et sont présents autant chez les végétaux que chez les animaux. Ils sont soit synthétisés à l'intérieur des cellules du corps, soit absorbés à partir de la nourriture. Les acides gras non estérifiés (ou acides gras libres) sont non-polaires et classés selon la longueur de leur chaîne

carbonée. Ils possèdent plus de 20 atomes de carbones pour les acides gras à très longues chaînes, entre 12 et 20 carbones pour les acides gras à longue-chaîne, de 6 à 12 carbones pour les acides gras à chaîne moyenne, et moins de 6 carbones pour les acides gras à chaîne courte. L'ester de coenzyme A (acyl-CoA) est la forme métaboliquement active des acides gras dans la cellule (*Yaney et Corkey, 2003*).

Suite à l'ingestion des aliments, les acides gras libres sont absorbés par les cellules de la muqueuse intestinale et estérifiés en glycérolipides dont le TG, composé d'une molécule de glycérol conjugué à trois molécules d'acides gras libres. Les TG sont ensuite libérés dans la circulation sanguine. Le TG est l'unité de stockage énergétique chez les mammifères et voyage dans le sang sous la forme de lipoprotéines dont les chylomicrons (des intestins vers les tissus périphériques) et les VLDL (du foie vers les tissus périphériques). Les enzymes lipoprotéines lipases permettent l'hydrolyse des TG au niveau des tissus périphériques et donc la captation des acides gras libres ainsi générés qui pénètrent par diffusion à travers la membrane plasmique dans la cellule. Suite à leur diffusion dans la cellule, les molécules d'acides gras sont liées par la protéine cytoplasmique FABP (*fatty acid binding protein*), ce qui augmente leur solubilité et protège la cellule de leur effet 'détergent'. Ils sont ensuite activés en acyl-CoA par l'enzyme cytoplasmique acyl-CoA synthétase afin de permettre leur métabolisme.

Un autre membre important de la famille des acides gras est le cholestérol, un stéroïde animal essentiel à la synthèse de différentes hormones et au maintien de la structure des membranes cellulaires, leur donnant perméabilité et fluidité (*Maxfield et van Meer, 2011*). Il possède un groupe hydroxyle polaire et un gros groupement stérol non-polaire. Son assemblage en structures connues sous le nom de radeaux lipidiques joue un rôle important dans la signalisation intracellulaire en permettant l'interaction de différents récepteurs membranaires. Le cholestérol, tout comme le TG, est transporté dans le sang par les lipoprotéines de différentes tailles (chylomicrons, VLDL, LDL (*low-density lipoproteins*) et HDL (*high-density lipoproteins*)). Les HDL sont associées au rétro-transport du cholestérol, des tissus périphériques vers le foie, où il sera excrété sous forme d'acides

biliaires, ou vers d'autres tissus qui l'utiliseront pour la production d'hormone (*Voet et Voet*, 1995). Les HDL sont donc connus plus familièrement sous le nom de 'bon cholestérol'. En effet, un taux élevé de HDL sanguin est associé à un risque réduit de maladies cardiovasculaires, alors qu'un taux élevé de LDL est associé à un mauvais pronostic pour le développement de maladies cardiovasculaires (*Mureddu et al*, 2011).

2.2.1 Le malonyl-CoA : substrat et régulateur du métabolisme des lipides

À l'état postprandial, l'abondance du glucose entraîne son oxydation préférentielle comme source d'énergie, ayant pour conséquence le stockage des acides gras. Par contre, lorsque les concentrations de glucose circulant diminuent, les acides gras deviennent la source énergétique endogène principale dans la cellule β (*Malaisse et al*, 1983), entraînant l'augmentation de leur oxydation. Ceci corrèle avec une diminution de l'oxydation du glucose et l'augmentation de la gluconéogenèse dans le foie (*Randle*, 1998). Dans la cellule β , en situation d'abondance de glucose, l'export du citrate par la navette pyruvate-citrate décrite plus haut contribue à la formation du malonyl-CoA (*Farfari et al*, 2000) par l'enzyme ACC (Figure 8). Le malonyl-CoA est un pivot métabolique par son action inhibitrice de l'enzyme carnitine palmytoyl-transférase 1 (CPT1). Cette enzyme catalyse l'entrée des acyl-CoA à chaîne longues (LC-CoA, *long-chain CoA*) dans la mitochondrie. Ainsi, en présence de concentration élevées de glucose, l'élévation corrélative des concentrations de malonyl-CoA cytoplasmique inhibent l'enzyme CPT1, ce qui empêche l'entrée des LC-CoA dans la mitochondrie (*McGarry*, 2002) et les rend disponibles pour leur estérification en glycérolipides. Alternativement, lorsque la concentration de glucose s'abaisse, la concentration de malonyl-CoA diminue, relevant l'inhibition de CPT1, ce qui permet l'entrée des LC-CoA dans la mitochondrie où ils pourront être oxydés et ainsi, agir comme principale source énergétique pour la cellule. La concentration de malonyl-CoA agit donc comme régulateur du métabolisme des acides gras dans la cellule β (*Prentki et al*, 2002). Par contre, comme la synthèse des acides gras de novo est très basse dans la cellule

β normale, le malonyl-CoA n'est pas utilisé comme substrat pour la synthèse des LC-CoA mais régule l'utilisation des acides gras comme source énergétique (MacDonald et al, 1992). En effet, l'expression de l'acide gras synthétase est très faible dans les îlots de Langerhans de rat normaux (Brun et al, 1996). Le rôle du malonyl-CoA dans la SIIG sera discuté plus bas.

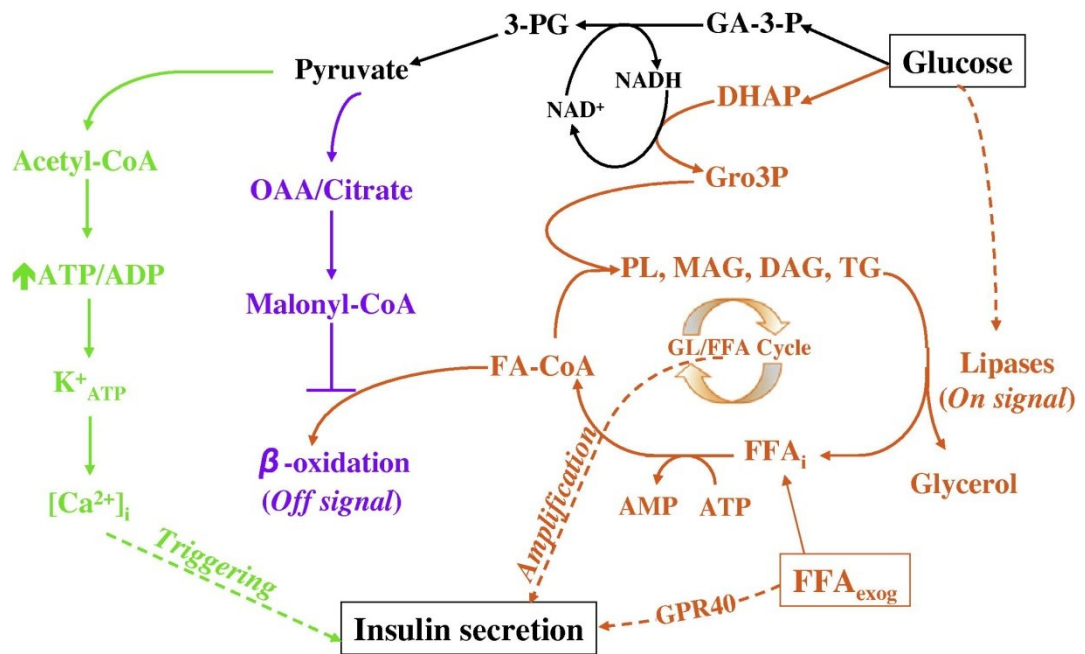


Figure 8. Le malonyl-CoA, régulateur du métabolisme des lipides

Ce modèle représente l'interaction synergistique entre le métabolisme du glucose et des lipides pour promouvoir la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique. La production de citrate par anaplérose/cataplérose entraîne la production du malonyl-CoA, qui par son action sur l'enzyme CPT-1, inhibe l'entrée des acides gras-CoA dans la mitochondrie et prévient donc leur oxydation. Les acides gras-CoA sont alors redirigés vers le cycle TG/FFA (GL/FFA sur cette figure) afin de produire des molécules lipidiques signalétiques potentialisatrices de la sécrétion d'insuline. (Tiré de (Prentki et Madiraju, 2012) avec l'autorisation du Dr Marc Prentki).

2.2.2 L'oxydation des acides gras

L'oxydation des acides gras est la voie métabolique par laquelle les acyl-CoA sont convertis en molécules d'acétyl-CoA dans le but de produire de l'ATP. Dans la cellule β , tel que mentionnée précédemment, l'oxydation des acides gras est augmentée quand le glucose vient à manquer.

La première étape de cette voie métabolique est l'entrée des acyl-CoA dans la mitochondrie. Comme les réserves mitochondriales et cytoplasmiques de CoA sont distinctes, les LC-CoA cytoplasmiques ne peuvent traverser la double-membrane mitochondriale par simple diffusion. C'est donc à l'aide du cofacteur L-carnitine et des enzymes CPT1 et CPT2 que les LC-CoA entrent dans la mitochondrie où ils seront oxydés (*Bahl et Bressler, 1987*). Les acyl-CoA cytosoliques sont donc premièrement transformés en acyl-carnitine par l'enzyme CPT1 située sur la face externe de la membrane interne mitochondriale. L'acyl-carnitine à longue chaîne traverse ensuite la membrane interne mitochondriale à l'aide d'un transporteur, la translocase, en échange d'une molécule de L-carnitine. Une fois du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale, la molécule d'acyl-carnitine est reconvertie en acyl-CoA par l'action de l'enzyme CPT2.

Par la suite, l'oxydation des acyl-CoA se produit grâce à un cycle de quatre réactions enzymatiques (Figure 9). Premièrement, l'enzyme acyl-CoA déshydrogénase catalyse la déshydrogénation de l'acyl-CoA, entraînant la production d'une molécule d'énoyl-CoA et de FADH_2 . Deuxièmement, l'énoyl-CoA est transformé en 3-hydroxyacyl-CoA par l'enzyme enoyl-CoA hydratase, qui utilise une molécule d'eau. Troisièmement, l'enzyme 3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase catalyse la déshydrogénation NAD^+ -dépendante du 3-hydroxyacyl-CoA, produisant un kétoacyl-CoA et une molécule de $\text{NADH} + \text{H}^+$. Enfin, la dernière réaction est le clivage du lien entre les carbones α et β par l'enzyme β -ketoacyl-CoA thiolase, produisant une molécule d'acétyl-CoA et une molécule d'acyl-CoA ayant une chaîne carbonée écourtée de deux carbones. Cette molécule d'acyl-CoA écourtée devient alors le substrat de la première réaction, et ainsi de suite, le cycle de

poursuivra jusqu'à l'oxydation complète de la molécule d'acyl-CoA. Ainsi, lors de l'oxydation de l'acide gras à chaîne longue palmitate (C16:0), 8 molécules d'acétyl-CoA seront produites. L'acétyl-CoA produit est par la suite oxydé dans le cycle de Krebs, afin de stimuler la production d'ATP. Les molécules de $\text{NADH} + \text{H}^+$ ainsi que de FADH_2 produites au cours du cycle donnent leurs électrons à la chaîne respiratoire, contribuant aussi à la production d'ATP (Voet et Voet, 1995).

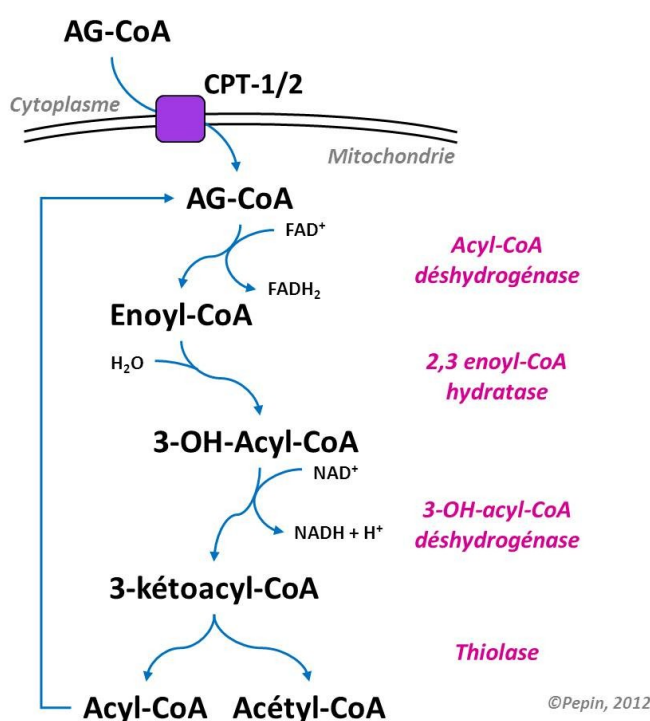


Figure 9. β -oxydation des acides gras

Les acyl-CoA (AG-CoA) cytoplasmiques sont convertis dans la cellule β pancréatique en acyl-carnitine (non-illustré sur ce schéma) par l'enzyme CPT-1, entrent dans la mitochondrie et sont reconvertis en acyl-CoA par l'enzyme CPT-2. L'acyl-CoA est ensuite métabolisé par des complexes multi-enzymes pour produire de l'acétyl-CoA puis de l'ATP. Adapté du manuel de biochimie Voet and Voet (Voet et Voet, 1995).

2.2.3 Enzymologie de la β -oxydation en fonction de la longueur de la chaîne carbonée

L'entrée dans la mitochondrie des acides gras à longue chaîne est l'étape limitante de l'oxydation des LC-CoA. À l'opposé, les acides gras libres à chaîne courte peuvent pénétrer librement la mitochondrie où ils seront activés en acyl-CoA à courte chaîne. Par contre, les acides gras à chaîne moyenne peuvent soit utiliser la voie des acides gras à chaîne longue ou celle des acides gras à chaîne courte pour entrer dans la mitochondrie (*Bahl et Bressler, 1987*). Ainsi, comme seuls les LC-CoA dépendent exclusivement de l'enzyme CPT-1 pour entrer dans la mitochondrie, seule leur oxydation est dépendante des niveaux de malonyl-CoA, et donc régulée par la concentration cytoplasmique de glucose.

Par ailleurs, il existe plusieurs isoformes pour les enzymes catalysant les quatre étapes de l'oxydation des acides gras. Leur activité varie en fonction de la longueur de la chaîne carbonée, de leur localisation dans la mitochondrie et de leur organisation en complexes (Figure 10). Tout d'abord, il existe des enzymes spécifiques pour les acyl-CoA à chaîne très longue ou longue, et d'autres pour les acyl-CoA à chaîne moyenne ou courte. Par contre, des études de mutations des divers isoformes démontrent qu'il existe un chevauchement dans leur capacité catalytiques (*Nada et al, 1995*). Ainsi, en l'absence d'une enzyme spécifique pour les acyl-CoA à chaîne moyenne, l'enzyme spécifique pour les LC-CoA pourra catalyser la réaction avec une moins grande efficacité. Ensuite, la localisation intra-mitochondriale des différents isoformes est différente. Alors que les isoformes spécifiques pour les acyl-CoA à chaîne très longue ou longue se retrouvent attachés à la face matricielle de la membrane interne mitochondriale (*Izai et al, 1992; Uchida et al, 1992*), les enzymes spécifiques pour l'oxydation des acyl-CoA à chaîne moyenne et courte sont localisées dans la matrice mitochondriale (*Schulz, 1991*). Enfin, les enzymes sont organisées en complexes multi-enzyme comprenant l'activité nécessaire à la catalyse de chacune des étapes d'un cycle d'oxydation. Ceci permet la canalisation du substrat d'une enzyme à l'autre et maximise l'efficacité des réactions (*Nada et al, 1995*).

De ce fait, la déficience d'une enzyme du complexe d'oxydation d'acyl-CoA à chaîne moyenne n'entravera pas l'oxydation par le complexe des LC-CoA. Par contre, l'inhibition d'une des enzymes du complexe multi-enzyme résulte en la perte d'activité de l'ensemble du complexe (*Nada et al*, 1995).

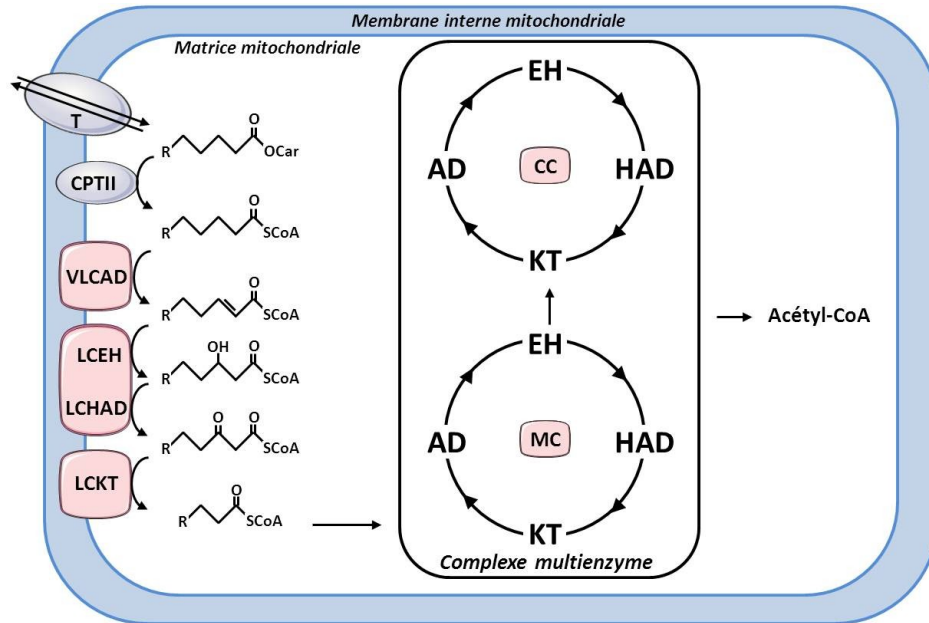


Figure 10. Localisation des différents isoformes des enzymes de la β -oxydation.

La partie gauche du schéma montre l'oxydation des acides gras à chaîne longue par les enzymes membranaires spécifiques à cette longueur de chaîne carbonée. Au centre, on retrouve le complexe multienzyme de la matrice spécialisé pour l'oxydation des acides gras à chaîne moyenne ou courte. VLCAD : acyl-CoA déshydrogénase pour acides gras à chaîne très longue; LCEH : enoyl-CoA hydratase pour acides gras à chaîne longue; LCHAD : hydroxyacyl-CoA déshydrogénase pour acides gras à chaîne longue; LCKT : ketoacyl-CoA thiolase pour acides gras à chaîne longue; MC : chaîne moyenne; CC : chaîne courte; AD : acyl-CoA déshydrogénase, EH : enoyl-CoA hydratase; HAD : hydroxyacyl-CoA déshydrogénase; KT : ketoacyl-CoA thiolase (*Adapté de (Nada et al*, 1995). Schéma réalisé à partir de Servier Medical Art, www.servier.fr/servier-medical-art).

2.3 Le cycle Triglycérides/Acides gras libres (TG/FFA)

Le cycle TG/FFA fait référence à une voie cyclique du métabolisme des acides gras. Ce cycle comprend deux phases : une première où les LC-CoA sont d'abord estérifiés à une molécule de glycérol généralement à la surface du réticulum endoplasmique, formant des glycérolipides complexes, suivi de la deuxième phase composée de l'hydrolyse de ces glycérolipides neutres, appelé lipolyse, permettant de relâcher les acides gras libres et le glycérol (voir figure 11). La lipolyse est généralement effectuée soit sur les gouttelettes lipidiques où le TG est généralement emmagasiné, soit au niveau de la membrane plasmique.

En présence de concentrations élevées de glucose et d'acides gras, il est probable que les niveaux cytoplasmiques de LC-CoA augmentent, mais ces niveaux n'ont jamais été mesurés. Par ailleurs, tel que discuté à la section 2.2.1, le métabolisme accru du glucose entraîne l'augmentation de la concentration cytoplasmique du malonyl-CoA, lequel inhibe l'oxydation des acides gras et les redirige vers la voie de l'estérification. De plus, l'augmentation de la glycolyse entraîne la production de Gly3P, la structure de base des glycérolipides. Dans le foie et le muscle, le Gly3P peut aussi provenir de la glycéronéogenèse ou du recyclage du glycérol cytoplasmique par l'action de l'enzyme glycérol kinase (GK). Par contre, la glycéronéogenèse est une voie métabolique peu active dans la cellule β car l'expression de l'isoforme cytoplasmique de PEPCK, étape limitante de la glycéronéogenèse, est absente dans la cellule β pancréatique (*MacDonald et al*, 1992). De plus, l'implication de l'isoforme mitochondrial de PEPCK dans la génération de glycérol reste à confirmer (*Stark et al*, 2009). Par ailleurs, des études chez les rongeurs et l'humain démontrent que l'activité de l'enzyme GK est très basse dans la cellule β en comparaison avec les cellules du foie (*Noel et al*, 1997). Donc, la source principale de Gly3P dans la cellule β est la glycolyse. Lors de l'estérification des acides gras, trois molécules de LC-CoA sont séquentiellement estérifiées à une molécule de Gly3P, générant successivement les lipides polaires acide lysophosphatidique (LPA, *lysophosphatidic acid*),

puis l'acide phosphatidique (PA, *phosphatidic acid*), suivi des lipides non-polaires sn1,2-DAG et enfin TG. Cette voie anabolique utilise l'ATP pour la formation du lien thioester des acyl-CoA, et cette énergie est transférée à la molécule de glycérolipide lors de l'estérification de l'acyl-CoA à la molécule de glycérol.

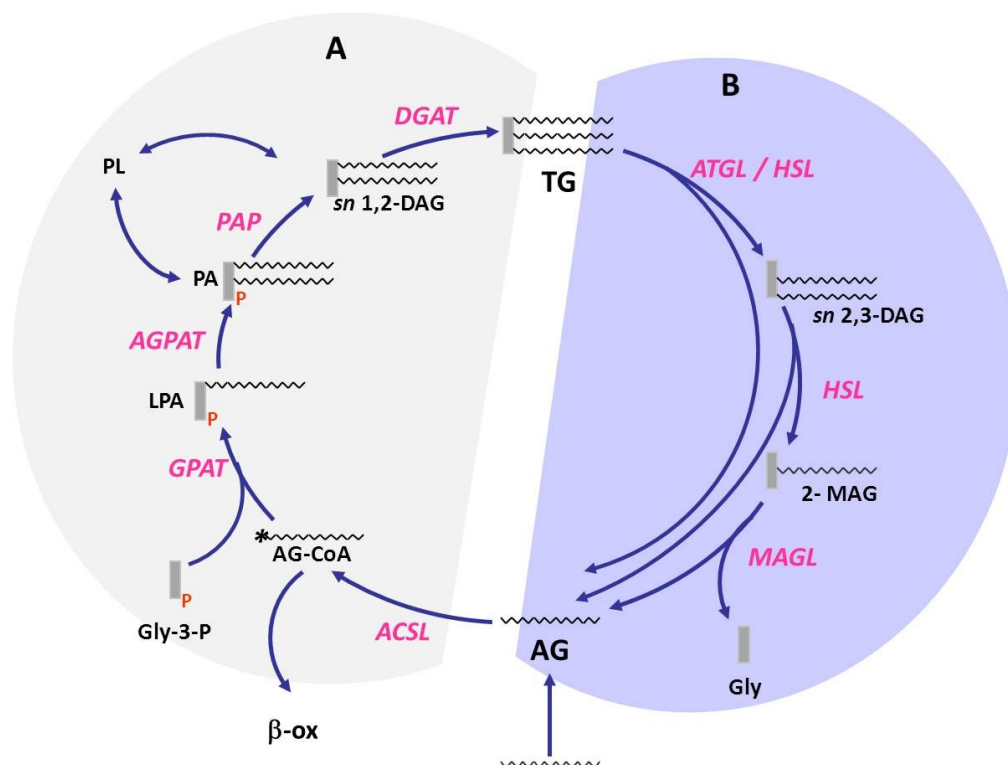


Figure 11. Cycle Triglycérides/Acides gras libres

Le cycle TG/FFA se divise en deux parties : A) l'estérification des acides gras et B) la lipolyse. AG : acides gras; Gly : glycérol; ACSL : acyl-CoA synthétase à chaîne longue; GPAT : Gly-3-P acyltransferase; AGPAT : 1-acyl-sn-Gly-3-P acyltransferase; PAP : PA phosphatase; DGAT : DAG acyltransferase; ATGL : adipose TG lipase; MGL : MAG lipase (Adapté de (Prentki et Madiraju, 2008))

La phase catabolique du cycle TG/FFA (Figure 11) comprend l'hydrolyse séquentielle des groupements acyle de la structure de glycérol par l'action de lipases. Cette

partie du cycle est appelée la lipolyse. Les TG sont tout d'abord hydrolysés en *sn* 2,3-DAG par l'action d'ATGL (*adipose triglyceride lipase*) ou HSL, puis le DAG en MAG par HSL, et enfin le MAG est hydrolysé par MGL (*MAG lipase*) pour libérer une molécule de glycérol. Pour chacune de ces étapes, une molécule d'acides gras libres est libérée, et l'énergie comprise dans le lien ester est libérée sous forme de chaleur. On qualifie couramment ce cycle de «futile» en raison de sa consommation d'ATP et d'une perte d'énergie qui est dissipée sous forme de chaleur (Prentki et Madiraju, 2008).

Le cycle TG/FFA génère plusieurs molécules lipidiques signalétiques capables de réguler plusieurs processus cellulaires dont la sécrétion d'insuline dans la cellule β , ce qui sera discuté plus loin (voir Section 3.3). La régulation de ce cycle est donc très importante et est assurée grâce aux multiples isoformes de chaque enzyme du cycle ainsi qu'à leur localisation intracellulaire spécifique. Par exemple, en ce qui a trait à l'estérification, il existe deux isoformes de l'enzyme PAP (*PA phosphatase*). PAP-1 est liée au réticulum endoplasmique où elle assure la synthèse du DAG nécessaire à la production de TG et à la formation de gouttelettes lipidiques. Quant à elle, PAP-2 est liée à la membrane plasmique et produit le DAG à partir du PA venant de l'hydrolyse de phospholipides, et est donc impliquée dans l'activation de cascades signalétiques (Prentki et Madiraju, 2008). Un autre exemple est l'enzyme GPAT, enzyme limitante de la synthèse des TG, dont quatre différents isoformes ont été identifiés jusqu'à ce jour, ayant une localisation mitochondriale ou réticulaire (Wendel et al, 2009). Par ailleurs, les différentes lipases responsables de l'hydrolyse des glycérolipides ont aussi des localisations intracellulaires bien particulières. ATGL, responsable de l'hydrolyse des TG, est située à la surface des gouttelettes lipidiques, localisation lui donnant un accès direct à son substrat (Smirnova et al, 2006). Des études récentes ont démontré que l'ATGL pourrait aussi être située à la face extracellulaire de la membrane plasmique (Notari et al, 2006). Si ces données sont confirmées dans la cellule β , ATGL contribuerait donc à la production d'acides gras libre pouvant activer le récepteur lié aux protéines G (GPCR) GPR40 et stimuler la sécrétion d'insuline. ATGL possédant, en plus de son activité TG lipase une activité transacylase

(Jenkins *et al*, 2004), elle contribue à la production de *sn* 1,2-DAG, la forme de DAG ayant des capacités signalétiques, à partir du *sn* 2,3-DAG généré lors de la lipolyse. Une autre lipase localisée sur les gouttelettes lipidiques est HSL (Miyoshi *et al*, 2006), responsable de l'hydrolyse du *sn* 2,3-DAG en MAG. La présence conjointe d'ATGL et HSL sur l'organelle de stockage des TG permet une hydrolyse efficace des glycérolipides. HSL a aussi été identifiée à la surface des granules d'insuline dans la cellule β (Lindvall *et al*, 2004). Ainsi, la production localisée de MAG par HSL pourrait contribuer à l'activation de l'effecteur de l'exocytose des granules de sécrétion *mammalian homologues of the C. elegans unc-13* (Munc13) (Iglésias et Prentki, communication personnelle). Il est à noter que la lipolyse en réponse au glucose corrèle avec l'augmentation de la sécrétion d'insuline (Roduit *et al*, 2001; Mulder *et al*, 2004).

Chapitre 3. Les voies principales de sécrétion d'insuline de la cellule β pancréatique en réponse aux nutriments calorigéniques

L'îlot de Langerhans est un senseur du niveau énergétique de l'organisme. Il intègre les signaux provenant des nombreux nutriments afin de moduler adéquatement la sécrétion des diverses hormones. La cellule β pancréatique est la source principale d'insuline dans le corps humain. L'insuline y est synthétisée, emmagasinée et enfin sécrétée dans la circulation sanguine (Figure 12). La sécrétion de l'insuline est régulée et stimulée par plusieurs facteurs dont les nutriments (le glucose en particulier) et certaines hormones. Les voies métaboliques responsables de la sécrétion d'insuline se divisent principalement en deux parties. Premièrement, la voie classique, dite voie d'induction de la sécrétion, est liée à la fermeture des canaux K^{ATP} et une augmentation du niveau de Ca^{2+} cytoplasmique. Ensuite, la voie d'amplification est responsable de l'effet du glucose *via* d'autres systèmes de transduction métabolique et de l'effet potentialisateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Enfin, certaines voies de signalisation sont aussi connues pour contribuer à la sécrétion d'insuline en réponse à divers nutriments et hormones.

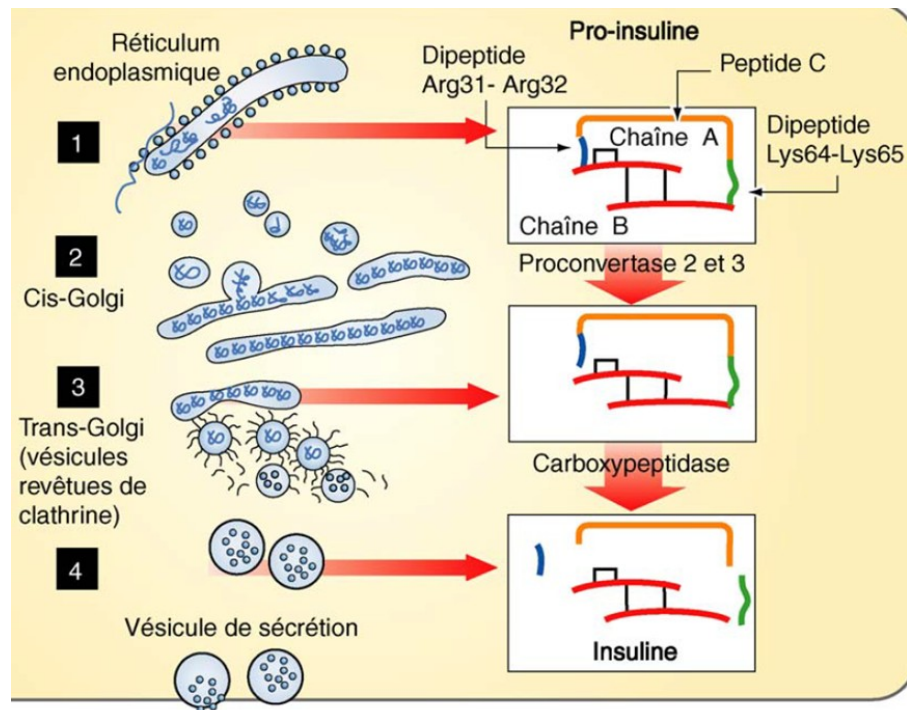


Figure 12: Formation de l'insuline et maturation des granules

1) La pré-pro-insuline produite dans le réticulum endoplasmique est transformée en pro-insuline par clivage enzymatique. 2) La pro-insuline migre dans le Cis-Golgi à l'intérieur de vésicules de transport. 3) La maturation finale de l'insuline a lieu par le clivage enzymatique de la pro-insuline. 4) L'insuline est emmagasinée sous forme de cristaux dans la granule sécrétrice (vésicule de sécrétion) et migre vers la membrane cellulaire. (Figure adaptée de (Magnan, 2005))

La sécrétion d'insuline induite par le glucose est diphasique (Figure 13). Lors de la première phase, l'insuline contenue dans les granules fusionnées à la membrane cytoplasmique est relâchée rapidement. Cette première phase est régulée par la voie classique de sécrétion (voir Section 3.1) et s'atténue en 10 minutes environ. La deuxième phase de sécrétion d'insuline implique le recrutement de nouvelles granules à la membrane. Elle est stimulée par les voies d'amplification de la sécrétion (voir Section 3.2), est beaucoup plus graduelle que la première et dure environ 45 minutes (Straub et Sharp, 2002). Chez l'humain et le rat, la deuxième phase de sécrétion est beaucoup plus accentuée

que la première phase. Par contre, chez la souris, en absence d'acides gras exogènes, on observe une première phase de sécrétion en réponse au glucose très robuste et une deuxième phase quasi-absente (Zawalich et Zawalich, 1996).

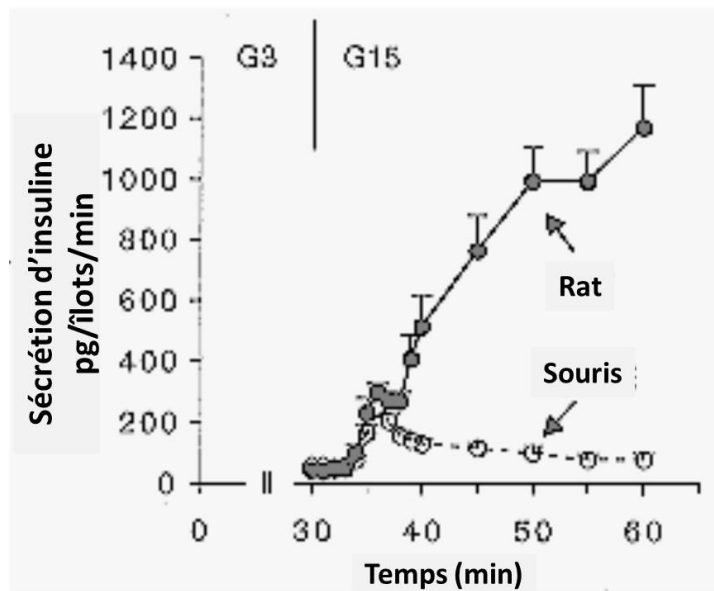


Figure 13. Sécrétion d'insuline diphasique chez le rat et la souris.

La première phase de sécrétion d'insuline se produit dans les 10 premières minutes suivant la stimulation au glucose (entre les temps 30 et 40 minutes) alors que la deuxième phase de sécrétion est beaucoup plus prononcée chez le rat que chez la souris (entre les temps 40 et 60 minutes) et peut se prolonger jusqu'à 1 h suivant la stimulation au glucose. G3: 3 mM glucose; G15: 15 mM glucose (Adapté de Zawalich et Zawalich, 1996).

3.1 Voie classique de la sécrétion d'insuline

La particularité de la sécrétion d'insuline par la cellule β réside dans le fait que c'est en grande partie le métabolisme des nutriments, et non seulement les nutriments eux-mêmes *via* des récepteurs membranaires, qui induisent la sécrétion de l'insuline (Malaisse et al,

1979). Le glucose est le sécrétagogue principal de la cellule β et est le seul nutriment capable de stimuler à lui seul la sécrétion d'insuline *in vitro* (Prentki *et al*, 1997). Le métabolisme du glucose par la glycolyse entraîne la production de pyruvate, qui une fois oxydé dans la mitochondrie par le cycle de Krebs, contribue à la synthèse d'ATP. L'augmentation du ratio ATP/ADP, conduit à la fermeture des canaux K_{ATP} -dépendants à la membrane plasmique, déclenchant la dépolarisation de la membrane, l'ouverture des canaux calciques voltages-dépendants (VDCC, *voltage-dependant calcium channels*), créant un influx de calcium qui induit l'exocytose des granules d'insuline (Ashcroft *et Rorsman*, 1990; Prentki, 1996) (Figure 14A). Cette voie métabolique est connue sous le nom de la voie classique de sécrétion d'insuline, et serait responsable de la première phase de sécrétion, au cours de laquelle le contenu des granules fusionnées à la membrane cytoplasmique est libéré par exocytose.

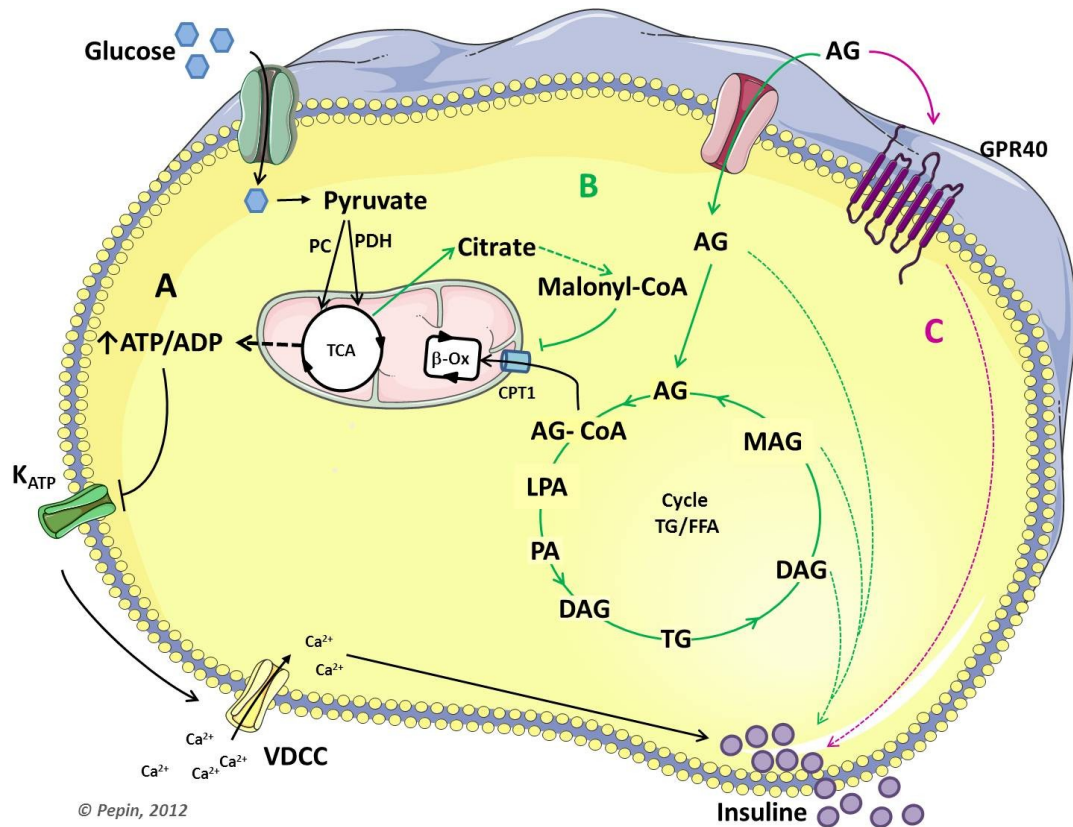


Figure 14. Mécanismes classique et d'amplification de la sécrétion d'insuline induite par les nutriments dans la cellule β

Les deux sécrétagogues les plus importants de la cellule β sont le glucose et les acides gras libres (AG). (A) en noir, la voie classique de sécrétion d'insuline; (B) en vert, la voie d'amplification et (C) en mauve, la voie de signalisation des acides gras à longue chaîne via le récepteur GPR40. β -Ox : β -oxydation des acides gras; AG-CoA : acyl-CoA; VDCC : canal calcique voltage-dépendant; K_{ATP} : canal potassique ATP-dépendant.

3.2 Voie d'amplification de la sécrétion d'insuline

En plus du glucose, les acides gras jouent aussi un rôle potentialisateur sur la sécrétion d'insuline. Par contre, une concentration de glucose permissive est essentielle à l'effet des acides gras. De plus, l'effet potentialisateur des différents types d'acide gras

augmente avec la longueur et diminue avec le degré d'insaturation de leur chaîne carbonée (Stein *et al*, 1997; Deeney *et al*, 2000). Tout comme le glucose, les acides gras potentialisent la sécrétion d'insuline en partie par leur métabolisme intracellulaire. En effet, en présence de concentrations élevées de glucose, ou en présence de glucose et d'acides gras, la voie classique n'est pas suffisante pour expliquer l'amplitude de la sécrétion d'insuline. Des expériences ont démontré que malgré un découplage entre le métabolisme du glucose et la fermeture des canaux K_{ATP} (par l'utilisation du diazoxide) tout en assurant la dépolarisation de la membrane cytoplasmique (par l'utilisation d'une concentration élevée de KCl) et l'influx de Ca^{2+} , le glucose et les acides gras peuvent induire la relâche des granules (Aizawa *et al*, 1994). Il existe donc une voie K_{ATP} -indépendante par laquelle le glucose et les acides gras stimulent la sécrétion d'insuline (Figure 14B). Lorsque la concentration de glucose est élevée, l'anaplérose et la cataplérose contribuent à l'augmentation du malonyl-CoA, favorisant le métabolisme des acides gras par le cycle TG/FFA. Ceci contribue à l'élévation de molécules lipidiques générées au cours du cycle TG/FFA tels le DAG, le LC-CoA ou les acides gras libres. Ceux-ci modulent l'activité de différents enzymes et peut être le degré d'acylation de certaines protéines importantes pour la sécrétion d'insuline.

Tout d'abord, les niveaux élevés de DAG peuvent activer certains membres de la famille des protéines kinases C (PKC) (Yaney *et Corkey*, 2003). Cependant, les cibles de ces kinases étant mal connues, et l'implication dans la régulation de la sécrétion d'insuline étant ambiguë pour certaines isoformes, leur voie signalétique menant à une augmentation de l'exocytose des granules est encore incertaine (voir Section 4.2). Les DAG peuvent aussi activer Munc13, une protéine d'exocytose reconnue comme étant un récepteur aux DAG (Bauer *et al*, 2007). L'activation de Munc13 par les DAG permet de lier l'augmentation de la lipolyse par le glucose avec la relâche des granules d'insuline et donc l'amplification de la sécrétion d'insuline par le cycle TG/FFA (Kwan *et al*, 2006). Deuxièmement, l'augmentation des niveaux cytoplasmiques des LC-CoA est associée à une augmentation de l'exocytose dans la cellule β (Deeney *et al*, 2000). Plus spécifiquement, des

concentrations élevées de LC-CoA pourraient accentuer la maturation des granules de sécrétion d'insuline provenant de l'appareil de Golgi, contribuant à l'augmentation de l'exocytose (*Corkey et al*, 2000). L'élévation des LC-CoA conduit peut-être aussi à l'acylation des diverses protéines, dont les protéines G, protéines importante pour la signalisation intracellulaire. Ces protéines doivent être dirigées à la membrane plasmique afin de remplir leur rôle signalétique (*Schmidt*, 1989), et c'est la myristoylation et palmytoylation de leur sous-unité α qui permet cette localisation (*Bouvier et al*, 1995). Certaines protéines G étant impliquées dans l'exocytose (*Olszewski et al*, 1994), leur localisation adéquate suite à l'élévation des niveaux de LC-CoA pourrait contribuer à l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Troisièmement, les acides gras libres produits lors de la lipolyse peuvent agir de façon autocrine/paracrine en activant GPR40 ou activer des facteurs de transcription tels les PPARs (*Duplus et al*, 2000). L'activation de cette famille de récepteurs nucléaires (en particulier PPAR α et PPAR γ) par les acides gras permet à la cellule de 'sentir' son état énergétique et de moduler le métabolisme des lipides en conséquence, ce qui influence la sécrétion d'insuline. L'activation de PPAR α entraîne une augmentation de l'oxydation des acides gras, et est ainsi associé à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (*Tordjman et al*, 2002; *Gremlich et al*, 2005).

La production de molécules lipidiques signalétiques par le cycle TG/FFA a donc des effets bénéfiques sur la sécrétion d'insuline, et ce par différentes voies. Le métabolisme des LC-CoA par ce cycle est donc reconnu comme un signal positif pour la sécrétion d'insuline. Alternativement, l'oxydation des acides gras par la mitochondrie fait diminuer les concentrations de LC-CoA et donc de molécules lipidiques signalétiques générées par le cycle TG/FFA. C'est pourquoi l'oxydation des acyl-CoA est reconnue comme un signal négatif pour la sécrétion d'insuline. Comme le malonyl-CoA est situé au confluent de ces deux voies métaboliques, il joue un rôle d'aiguillage pour le métabolisme des LC-CoA et est intimement lié à la sécrétion d'insuline. Aussi, une diminution des niveaux de malonyl-CoA entraîne une diminution de la sécrétion d'insuline par la cellule β (*Chen et al*, 1994c). Cependant, alors que les acides gras ont la capacité de potentialiser la sécrétion d'insuline

induite par le glucose, leur présence seule n'est pas suffisante à induire l'exocytose des granules d'insuline (*Gravena et al*, 2002). De plus, ce sont principalement les acides gras à chaîne longue ou les acides gras estérifiés qui bonifient la sécrétion. En effet, l'effet potentialisateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline augmente avec la longueur de leur chaîne carbonée, les acides gras de moins de huit carbones étant inefficaces (*Stein et al*, 1997).

Le récepteur GPR40 est présent dans plusieurs tissus, mais de façon particulièrement abondante dans les neurones et les cellules β pancréatiques (*Briscoe et al*, 2003). GPR40 est un GPCR α_{q11} liant les acides gras à chaîne moyenne ou longue. Les voies signalétiques qu'il active sont mal définies, mais semblent mener à l'activation de la phospholipase C, entraînant la production de DAG et d'inositol phosphate (IP3) qui causent respectivement l'activation des PKC et la mobilisation du Ca^{2+} cytoplasmique (*Birktoft et al*, 1987). GPR40 est maintenant bien connu pour médier une partie de l'effet amplificateur des acides gras sur la sécrétion d'insuline (*Latour et al*, 2007; *Kebede et al*, 2008; *Lin et al*, 2011). D'ailleurs, une mutation du récepteur chez l'humain est associée à une capacité sécrétoire diminuée (*Vettor et al*, 2008). De plus, l'étude d'un modèle murin portant une invalidation ubiquitaire du gène démontre que l'activation de GPR40 par les acides gras à chaîne longue contribue à l'amplification de la deuxième phase de la sécrétion d'insuline *in vivo* et *in vitro* (*Latour et al*, 2007; *Kebede et al*, 2008). L'activation du récepteur pourrait expliquer jusqu'à 50% de l'effet amplificateur des acides gras en fonction des concentrations de glucose présentes. Ceci fait de GPR40 une cible thérapeutique ayant suscité un vif intérêt dans les dernières années. Ainsi, plusieurs agonistes du récepteur ont été développés et certains démontrent des effets prometteurs dans des modèles de rongeurs pré-diabétiques tel le rat Zucker Fatty (*Lin et al*, 2011). Cependant, les voies métaboliques de signalisation impliquées dans la modulation de la sécrétion d'insuline par les acides gras sont encore à l'étude.

Enfin, certains acides aminés stimulent la sécrétion d'insuline. Le métabolisme de l'alanine, la glutamine et la leucine permettent une augmentation, par anaplérose, des

intermédiaires du cycle de Krebs, ce qui résulte en une production accrue d'ATP et stimule la sécrétion. La leucine est aussi un activateur allostérique de l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH), qui transforme le glutamate en α KG et ainsi contribue à l'anaplérose (*Newsholme et al*, 2006). Ainsi, le traitement de cellules β avec une combinaison de leucine et glutamine augmente la sécrétion d'insuline (*Somers et al*, 1981). De plus, l'arginine est un acide aminé dont la charge positive induit la dépolarisation de la membrane plasmique et ainsi, la relâche du contenu des granules (*de Oliveira et al*, 2011).

Chapitre 4. Enzymes et voies métaboliques associées à une régulation négative de la sécrétion d'insuline

La sécrétion d'insuline est un processus hautement régulé et complexe. Quoiqu'incomplète, notre compréhension des voies métaboliques potentialisatrices de la sécrétion d'insuline est assez avancée. Alors qu'un défaut de sécrétion contribue à l'hyperglycémie et au développement du DT2, une hypersécrétion peut mener à des épisodes d'hypoglycémie qui ont été reconnus comme très néfastes, entre autres chez les patients diabétiques. C'est pourquoi il existe des mécanismes qui préviennent l'hypersécrétion et ce, en situation normale ou pathologique. Nous avons entrepris dans ce projet de doctorat d'élucider certains de ces mécanismes. Seront discutés dans les sections suivantes l'implication de l'enzyme L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase spécifique aux acides gras à chaîne courte (SCHAD, *short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*), de la protéine kinase Cε (PKCε) et de la protéine AMPK.

4.1 SCHAD, un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline

L'hyperinsulinémie est une maladie diagnostiquée par des épisodes sévères d'hypoglycémies. Elle peut être causée par des lésions adénomateuses du pancréas, caractérisées par une hyperplasie focale ou diffuse, qui sont traitées soit par médication ou par pancréatectomie (Fekete et al, 2004; de Lonlay et al, 2005). Alternativement, cinq gènes ont été impliqués dans le développement de l'hyperinsulinémie. Tout d'abord, une mutation dominante inhibitrice des sous-unités SUR1 (*sulfonylurea receptor 1*) ou KIR6.2 du canal potassique ATP-dépendant (canal K_{ATP}) entraîne la dépolarisation prolongée de la membrane plasmique et une sécrétion d'insuline augmentée. Ensuite, une mutation de l'enzyme glucokinase augmente son affinité pour son substrat, le glucose, et contribue à l'augmentation de son métabolisme et de la sécrétion d'insuline. De plus, une mutation gain-de-fonction de l'enzyme GDH la rend résistante à l'inhibition par le GTP. Cette

augmentation de l'activité de GDH induit une augmentation du métabolisme mitochondrial, et contribue à l'augmentation de la sécrétion d'insuline en particulier suivant un repas riches en protéines. Finalement, des mutations diverses dans l'enzyme L-3-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase spécifiques pour les acides gras à chaîne courte (SCHAD), entraînant une diminution de l'activité de l'enzyme, causent une hyperinsulinémie (*de Lonlay et al*, 2005).

L'enzyme SCHAD est une protéine de la matrice mitochondriale catalysant la troisième réaction d'un cycle d'oxydation des acides gras. Elle transforme le L-3-hydroxyacyl-CoA à chaîne courte en L-3-ketoacyl-CoA et produit une molécule de NADH+H⁺. Son efficacité catalytique est maximale pour les hydroxyacyl-CoA ayant une chaîne de 6 carbones (*Barycki et al*, 1999). Elle agit en homo-dimère et chaque sous-unité est composée de deux domaines : la partie N-terminale assure la liaison au cofacteur nicotinamide dinucléotide (NAD) alors que la partie C-terminale permet la liaison au substrat ainsi que la dimérisation (*Birktoft et al*, 1987). SCHAD est exprimé à des niveaux élevés dans le muscle cardiaque, mais aussi dans le pancréas, le foie, le rein et le muscle squelettique. Par contre, les ratios d'ARN messagers (ARNm) de SCHAD relativement aux autres enzymes de l'oxydation des acides gras sont particulièrement élevés dans la cellule β , étant en moyenne de 30 :1 dans des lignées cellulaires ou des cellules primaires β de rats, alors que ce ratio est habituellement de 0,9 :1 dans d'autres tissus (*Hammar et Berne*, 1970; *Agren et al*, 1977; *Vredendaal et al*, 1996; *Martins et al*, 2011)

La manifestation typique chez l'humain d'une mutation d'une des enzymes de l'oxydation des acides gras est une hypoglycémie/hypocétonimie, accompagnée d'une dysfonction hépatique et d'une acidification systémique. Ces symptômes apparaissent généralement en période d'augmentation des besoins énergétiques et sont observés pour la première fois en bas âge. On observe de plus chez ces patients une augmentation des acides gras libres et une diminution des corps cétoniques en circulation (*Eaton et al*, 2003). Les symptômes s'apparentent au syndrome de Reye, où une encéphalopathie accompagne les dommages hépatiques (*Bennett et al*, 2006). Lors des épisodes d'hypoglycémie, on observe

une insulïnémie normalement basse. Par contre, comme mentionné précédemment, la mutation de l'enzyme SCHAD entraîne une hypoglycémie causée par une hyperinsulïnémie. De toutes les enzymes impliquées dans l'oxydation des acides gras, seule la mutation de SCHAD entraîne une hyperinsulïnémie.

Les mutations de SCHAD sont récessives et les patients décrits dans la littérature sont généralement issus d'une famille à haut degré de co-sanguinité. Les mutations de SCHAD sont diverses (mutations ponctuelles, créant un défaut d'épissage ou induisant la production d'une protéine tronquée) mais causent toutes une diminution de l'activité de l'enzyme. Au début du présent projet de doctorat, cinq cas cliniques avaient été décrits (*Clayton et al*, 2001; *Molven et al*, 2004; *Hussain et al*, 2005; *Bennett et al*, 2006). L'hyperinsulïnémie était diagnostiquée suite à des épisodes sévères d'hypoglycémie en très bas âge. En plus de l'hypoglycémie et l'hyperinsulïnémie, les patients avaient une accumulation des métabolites L-3-hydroxybutyryl-carnitine dans le sang et L-3-hydroxyglutarate dans l'urine. L'amplitude de la perte d'activité de SCHAD chez ces patients était corrélée avec le degré d'hyperinsulïnémie mais le mécanisme métabolique responsable de l'hyperinsulïnémie n'était pas alors connu. Malgré le petit nombre de patients répertoriés, il est raisonnable d'avancer qu'il existe d'autres cas d'hyperinsulïnémie due à une mutation de SCHAD non-diagnostiqués. En effet, ces patients se présentent dans une institution de santé souffrant d'une hypoglycémie sévère et, étant de très bas âge, sont souvent traités très rapidement, sans évaluation approfondie de leur condition. La mesure de l'insulïnémie n'étant pas effectuée de routine (*Burtis et al*, 1999), il est fort probable que dans plusieurs cas, l'hyperinsulïnémie causée par la mutation de SCHAD ait été sous diagnostiquée. D'ailleurs, suite aux différentes études, l'augmentation des concentrations des métabolites hydroxybutyryl carnitine dans le sang et l'hydroxyglutarate dans l'urine (*Molven et al*, 2004) a été reconnu comme marqueur diagnostique de la maladie.

L'expression particulièrement élevée de SCHAD dans les îlots de Langerhans, de même que l'hyperinsulïnémie qui découle de la diminution d'activité de l'enzyme ont

mené notre laboratoire à poser l'hypothèse selon laquelle SCHAD serait une protéine importante dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans la cellule β . Plus précisément, SCHAD agirait comme régulateur négatif de la sécrétion d'insuline, d'où l'augmentation de l'insulinémie due à la diminution de sa fonction. Les mécanismes impliqués étant alors inconnus, ils ont été l'un des sujets de mon étude doctorale.

4.2 PKC ϵ , régulateur de la sécrétion en présence d'acides gras

Les PKC constituent une famille de Ser/Thr kinases qui sont exprimées de façon ubiquitaire. Les dix membres sont divisés en trois sous-groupes : les PKC classiques (cPKC, α, β, γ), les PKC nouvelles (nPKC, $\delta, \epsilon, \eta, \theta$) et les PKC atypiques (aPKC, ζ, λ) qui diffèrent dans leur structure et leur mode d'activation. Les cPKC sont activés suite à la liaison au Ca^{+2} et au DAG, alors que les nPKC ne lient que le DAG. Les aPKC quant à elles ne sont pas activées par le Ca^{+2} ni par le DAG mais le sont plutôt par la signalisation en aval d'un GPCR, notamment par la kinase PI3K (*Tian et al*, 1996). Leur structure comprend une portion régulatrice en N-terminal, où se trouvent les domaines C1 et C2 (absent chez les aPKC) ainsi qu'une portion catalytique en C-terminal formée du domaine Ser/Thr kinase. Le domaine C1 des cPKC permet la liaison au DAG et leur domaine C2 lie le Ca^{+2} . Ensuite, en ce qui a trait aux nPKC, le domaine C1 lie le DAG et le domaine C2, différent des cPKC, a une fonction mal définie. Il pourrait faciliter les interaction protéine-protéine (*Gallegos et Newton*, 2008) ou permettre la liaison aux phospholipides pour un meilleur ancrage à la membrane (*Newton et Messing*, 2010). Finalement, pour les aPKC, leur domaine C1 n'est sensible ni au DAG ni au Ca^{+2} , mais leur activité catalytique est dépendante de la liaison à la phosphatidylsérine (*Idris et al*, 2001).

L'activité des PKC est régulée de quatre façons. Soit par la liaison à un cofacteur (ex. Ca^{+2} ou DAG), par la phosphorylation, par des interactions protéines-protéines ou par une dégradation régulée de la protéine. Les PKC possèdent trois sites de phosphorylation

situés dans trois portions du domaine catalytique soit la boucle d'activation, le motif tournant (*turn motif*) et le motif hydrophobe. Ces sites sont phosphorylés de façon constitutive et confèrent à la protéine une localisation cytoplasmique. Ce n'est que suite à la liaison au DAG ou au Ca^{+2} que la kinase est activée et transloque à la membrane (Newton, 2009). Ainsi, la mesure d'activité des PKC ne peut être effectuée avec confiance en ne regardant que les niveaux de phosphorylation. C'est pourquoi la translocation à la membrane plasmique est une mesure d'activité fréquemment utilisée dans la littérature, mais qui peut être faussée par le protocole d'extraction et de fractionnement cellulaire. Enfin, la phosphorylation des cibles de PKC est sans doute la meilleure approche pour mesurer leur activité, cependant il existe une certaine redondance dans l'activité des divers isoformes, et le manque d'inhibiteur spécifique rend difficile la dissection des voies signalétiques des PKC.

L'implication de diverses PKC dans le développement de l'insulino-résistance a été étudiée en détail. On observe chez les patients obèses diabétiques une augmentation des niveaux protéiques de PKC α , ϵ et ζ dans le foie (Considine et Caro, 1993). De plus, des niveaux élevés de PKC δ , ϵ et θ ont été observés dans le muscle de rats devenus résistants à l'insuline suite à une diète riche en gras (Schmitz-Peiffer et al, 1997) ou de rats Zucker Fatty (Qu et al, 1999). Les niveaux accrus d'acides gras circulants associés à l'obésité et au DT2 entraînent une augmentation des niveaux d'acides gras intracellulaires, dont les TG et les DAG, menant à l'activation accrue de certaines PKC. Ceci a pour conséquence la phosphorylation inhibitrice de plusieurs cibles sur des résidus sérine, dont plusieurs membres de la voie de signalisation du récepteur à l'insuline. Entre autres, il a été démontré que dans le foie, l'interaction entre PKC ϵ et le récepteur à l'insuline empêcherait la capacité de ce dernier à phosphoryler ses cibles en aval. De plus, une protéine adaptatrice du récepteur à l'insuline, l'IRS1 peut être phosphorylé par plusieurs PKC, ayant pour conséquence la diminution d'activation de la PI3K et conséquemment, l'inhibition du métabolisme du glucose (Dey et al, 2006; Schmitz-Peiffer et Biden, 2008), en plus

d'augmenter la dégradation de IRS1 (*Schmitz-Peiffer et Biden, 2008*), contribuant au développement de l'insulino-résistance.

L'implication des diverses PKC dans la dysfonction de la cellule β a été beaucoup moins étudiée que dans l'insulino-résistance. La démonstration qu'un traitement au DAG ou au phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, analogue du DAG, activateur des PKC) cause une sécrétion accrue des îlots en réponse au glucose (*Jones et Persaud, 1998*) fut une des premières évidences en faveur d'une implication des PKC dans la régulation de la sécrétion d'insuline. Tout comme dans les tissus cibles de l'insuline, l'augmentation des niveaux d'acide gras libres, mais aussi de la glycémie, contribuerait à l'activation des PKC. En effet, la dyslipidémie cause une augmentation des niveaux de DAG et d'acyl-CoA à chaîne longue dans la cellule β , contribuant à l'activation des PKC. De plus, l'augmentation de la concentration de glucose entraîne la production accrue du malonyl-CoA, favorisant la synthèse de lipides complexes par le cycle TG/FFA, contribuant à l'augmentation des niveaux de DAG et à l'activation des PKC.

La cellule β exprime les isoformes α , β II, δ , ϵ , λ et ζ , qui remplissent des fonctions diverses. Tout d'abord, l'isoforme α a été démontré comme ayant peu ou pas d'influence sur la sécrétion d'insuline induite par le glucose, malgré une translocation marquée à la membrane plasmique en réponse au glucose (*Ganesan et al, 1992; Carpenter et al, 2004*). Ensuite, l'isoforme δ a été bien étudié pour sa fonction pro-apoptotique. En effet, la surexpression dans les îlots de la protéine ayant un site catalytique inactif (PKC δ -KD, *kinase dead*) les protège de l'apoptose induite par une exposition chronique aux acides gras (*Carpenter et al, 2004*). Cependant, la sécrétion d'insuline n'étant pas affectée par ces conditions (*Carpenter et al, 2004*) et la translocation à la membrane de PKC δ n'étant pas induite par le glucose (*Pinton et al, 2002; Warwar et al, 2006*), il semble que PKC δ n'est pas impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline dans la cellule β . Par ailleurs, il a été démontré que l'isoforme PKC ζ n'est pas impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline mais est important dans la réponse proliférative induite par les facteurs de

croissance tels le GLP-1, l'IGF-1 ou l'HGF (*hepatocyte growth factor*) (Buteau et al, 2001; Hennige et al, 2002; Vasavada et al, 2007). De plus, il module l'expression de différents facteurs de transcription, dont celle de PDX-1, suite à une stimulation au glucose (Biden et al, 2008).

Enfin, de tous les isoformes exprimés dans la cellule β , seul PKC ϵ est connu pour être impliqué dans la régulation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. Les travaux du laboratoire du Dr Biden depuis 2007 ont permis d'établir que cet isoforme est un modulateur négatif de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, dans un contexte d'exposition prolongée à un environnement riche en acide gras (Schmitz-Peiffer et al, 2007). Plus précisément, l'invalidation ubiquitaire du gène PKC ϵ chez la souris prévient la dysfonction sécrétrice de la cellule β suite à une diète riche en gras en favorisant le métabolisme des lipides par le cycle TG/FFA plutôt que leur oxydation. Ces résultats ont été confirmés dans un modèle animal de DT2, la souris db/db, où l'inhibition de PKC ϵ par un peptide inhibiteur a permis de restaurer la sécrétion en réponse au glucose, qui est déficiente dans ce modèle (Schmitz-Peiffer et al, 2007). Des études subséquentes ont démontré que PKC ϵ régule négativement la lipolyse, et que son absence augmente cette voie métabolique, permettant la génération accrue de molécules signalétiques lipidiques et favorisant la sécrétion d'insuline (Cantley et al, 2009). PKC ϵ serait donc un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline via son effet sur la lipolyse. Cependant, comme il nécessite une concentration élevée de DAG afin d'être activé, cet isoforme ne serait pas impliqué dans la régulation de la sécrétion en situation normale mais plutôt en situation de dyslipidémie. D'ailleurs, son inhibition dans les souris db/+ ne change par la sécrétion d'insuline en réponse au glucose (Schmitz-Peiffer et al, 2007). Ainsi, le développement d'une thérapie inhibitrice de PKC ϵ est considéré depuis quelques années comme piste de traitement du DT2 mais ces efforts sont freinés par le manque de connaissance du mécanisme par lequel il régule la sécrétion et le métabolisme des acides gras. D'ailleurs, en ce qui a trait à la cellule β , la connaissance des cibles de PKC ϵ est très limitée. Une

interaction entre PKC ϵ et F-actine a été démontrée (*Prekeris et al*, 1996; *Prekeris et al*, 1998) et aurait pour conséquence l'inhibition de la dépolymérisation des filaments d'actine, une étape importante dans la migration des granules d'insuline de réserve vers la membrane plasmique afin d'assurer la deuxième phase de sécrétion (*Hernandez et al*, 2001). La phosphorylation de F-actine par PKC ϵ contribuerait donc à l'inhibition de la sécrétion d'insuline. Cependant, comme ces études ont été réalisées dans les neurones et les fibroblastes, ce phénomène reste à être démontré dans la cellule β pancréatique.

4.3 AMPK, un senseur énergétique de la cellule

La protéine AMPK est une Ser/Thr kinase exprimée de façon ubiquitaire. Elle est constituée d'un complexe hétéro-trimérique comprenant la sous-unité catalytique α et les deux sous-unités régulatrices β et γ . Plus précisément, la sous-unité α comprend le domaine Ser/Thr kinase, dont la phosphorylation de l'acide aminé Thr¹⁷² est synonyme d'activation de la protéine, en plus d'un domaine d'interaction avec les sous-unités β et γ . Ensuite, la sous-unité β comprend un domaine de liaison au glycogène important pour son activité dans le muscle, de même qu'un domaine d'interaction avec les sous-unités α et γ formant le cœur de la protéine. Enfin, la sous-unité γ contient le domaine de liaison aux nucléotides adénosines phosphates AMP et ATP. Deux molécules d'AMP ou d'ATP peuvent se lier au domaine γ de façon mutuellement exclusive, l'AMP se liant avec une affinité cinq fois supérieure à l'ATP (*Hardie*, 2007; *Viollet et al*, 2007). L'AMP est un activateur allostérique et l'ATP un inhibiteur allostérique d'AMPK (*Hardie*, 2011b).

L'AMPK est une protéine clé dans le maintien de l'homéostasie énergétique de la cellule. Elle module l'adaptation au statut nutritionnel et environnemental de la cellule. En effet, l'AMPK est activée par une diminution du niveau énergétique de la cellule, se caractérisant par une augmentation du ratio AMP/ATP (*Rutter et al*, 2003). Ceci survient lors de stress métaboliques tels la diminution des concentrations de nutriments, l'exercice,

l'hypoxie ou le stress oxydant (*Ruderman et Prentki*, 2004). L'AMPK est aussi activée par certaines hormones dont l'adiponectine et la leptine (*Viollet et al*, 2007). L'activation d'AMPK se fait d'abord par la liaison de l'AMP, ce qui rend la protéine apte à être phosphorylé par les kinases LKB1 et CAMKK β (*calmodulin-dependant protein kinase kinase β*) sur l'acide aminé Thr¹⁷² (*Hardie et Carling*, 1997). De plus, la liaison à l'AMP rend aussi la protéine moins susceptible à être déphosphorylée par les protéines phosphatase (*Hardie*, 2007).

Jusqu'à maintenant, seulement deux kinases ont été décrites pour leur capacité à phosphoryler AMPK et plusieurs molécules thérapeutiques activatrices d'AMPK ont été développées. Premièrement, la Ser/Thr kinase LKB1 a été décrite initialement comme un gène suppresseur de tumeur impliqué dans le syndrome Peutz-Jeghers, une forme de cancer de l'intestin (*Hemminki et al*, 1998; *Miyaki et al*, 2000). Elle a une localisation prédominante au noyau, mais suite à sa déacétylation par la protéine SIRT1, elle transloque vers le cytoplasme, se lie aux protéines MO25 et STRAD, et active par phosphorylation 13 différentes protéines dont AMPK (*Lan et al*, 2008; *Fu et al*, 2009). Elle est l'activatrice principale d'AMPK quand les niveaux d'énergie de la cellule baissent (*Ruderman et al*, 2010). Deuxièmement, la kinase CAMKK β active AMPK suite à une augmentation de la concentration intracellulaire de Ca⁺² entre autres causée par les hormones (*Hawley et al*, 2005). Son activation de l'AMPK jouera un rôle important dans le cerveau, l'endothélium vasculaire et les lymphocytes B (*Ruderman et al*, 2010). Étant donné que l'influx de Ca⁺² cytoplasmique précède l'activation de procédés nécessitant de l'ATP comme la sécrétion, l'activation d'AMPK par CAMKK β pourrait être un mécanisme d'anticipation pour subvenir à la demande en ATP à venir (*Hardie*, 2011a). Troisièmement, plusieurs analogues de l'AMP, drogues et nutraceutiques activent AMPK. Tout d'abord, l'AICAR (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribotide) est un analogue de l'AMP reconnu pour activer l'AMPK. La metformine, l'agent thérapeutique le plus prescrit aux patients souffrants de DT2, serait un inhibiteur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, entraînant une diminution de la synthèse d'ATP, une augmentation de la

concentration d'AMP et ainsi, l'activation de l'AMPK. Une autre classe d'agents thérapeutiques, les thiazolidinediones (TZD) activeraient l'AMPK par le même mécanisme (*Brunmair et al*, 2004). Cependant, ce mode d'action reste à confirmer et ne serait pas la seule façon par laquelle ces drogues produisent leur effet hypoglycémiant. Enfin, l'AMPK est activé par des molécules présentes dans certains aliments, les nutraceutiques dont le resvératrol dans le vin rouge, l'épigallocatechine dans le thé vert, et la capsaïcine dans le piment fort (*Hardie*, 2011b).

L'AMPK joue le rôle de commutateur métabolique et énergétique dans la cellule. Son activation entraîne l'inhibition de processus anaboliques consommateurs d'ATP et augmente les processus cataboliques générateurs d'ATP. Premièrement, il limite la consommation d'ATP en diminuant la synthèse des acides gras par la phosphorylation inhibitrice de l'ACC1 (enzyme responsable de la production du malonyl-CoA, un précurseur des acides gras) et de GPAT (étape limitante de la synthèse des glycérolipides) (*Carling et al*, 1989; *Hardie*, 2007). De plus, l'AMPK inhibe la synthèse du cholestérol en phosphorylant l'enzyme limitante, l'hydroxyméthylglutaryl-Coenzyme A reductase (HMGCR) (*Carling et al*, 1989). De façon plus indirecte, l'AMPK diminue l'expression de gènes importants dans la synthèse des acides gras par l'inhibition du facteur de transcription *sterol regulatory element-binding protein 1C* (SREBP-1C) (*Li et al*, 2011). Ensuite, l'AMPK inhibe la synthèse protéique, une voie métabolique nécessitant de grandes quantités d'ATP, par la phosphorylation du facteur d'élongation eEF2 (*Horman et al*, 2002) ainsi que les protéines *tuberous sclerosis protein 2* (TSC2) (*Inoki et al*, 2003) et Raptor (*Gwinn et al*, 2008), membres de la voie de signalisation de mTOR (*mammalian target of rapamycin*), importante pour la prolifération cellulaire.

Deuxièmement, l'AMPK favorise la production d'ATP en activant des voies métaboliques telles l'oxydation des acides gras et la captation du glucose dans les muscles squelettiques. L'AMPK active l'oxydation des acides gras par la phosphorylation inhibitrice d'ACC2, causant une diminution de la production du malonyl-CoA et permettant l'entrée des acides gras dans la mitochondrie où leur oxydation générera de

l'ATP (*Hardie et Carling, 1997*). Il a aussi été démontré que l'AMPK accroît la captation du glucose par les muscles en augmentant l'activité, la translocation à la membrane et la transcription des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4 (*Kurth-Kraczek et al, 1999; Zheng et al, 2001*). Enfin, l'AMPK contribue à la production d'ATP en augmentant la biogénèse de la mitochondrie principalement par l'activation du coactivateur transcriptionnel *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha* (PGC-1 α). Cette activation est à la fois directe, par phosphorylation, et indirecte, par l'activation de SIRT1, une déacétylase NAD⁺-dépendante qui active PGC-1 α par déacétylation. L'activation de PGC-1 α a pour conséquence la transcription de gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras ou codant pour des protéines importantes de la matrice mitochondriale (*Lin et al, 2005*).

Troisièmement, la régulation par SIRT1 est une voie par laquelle l'AMPK exerce son action. SIRT1 est activée entre autres par l'augmentation du NAD⁺ dans la cellule. Ainsi, l'activité de SIRT1, tout comme l'AMPK, est dépendante du statut énergétique, et tout comme AMPK, SIRT1 régule plusieurs voies métaboliques dont la lipolyse, l'oxydation des acides gras et l'activité mitochondriale (*Feige et al, 2008*). SIRT1 enlève les groupements acétyl de plusieurs protéines, dont les histones et certains facteurs de transcription mais aussi d'autres protéines cytoplasmiques comme PGC-1 α et LKB1 qui s'en trouvent activées (*Feige et Auwerx, 2008*). Le modèle signalétique actuel démontre que l'AMPK et SIRT1 réguleraient mutuellement l'activité de l'autre protéine (*Ruderman et al, 2010*). Ainsi, la diminution de la concentration d'ATP active l'AMPK, qui favorise les voies métaboliques productrices d'ATP. La concentration de NAD⁺ augmente alors, activant SIRT1, menant à la déacétylation de LKB1, à la phosphorylation et l'activation d'AMPK (*Lan et al, 2008*). De plus, l'activation de l'AMPK est associée à l'activation de l'enzyme Nampt impliquée dans la biosynthèse du NAD (*Fulco et al, 2008*). Ainsi, ce cycle d'activation donne lieu à la phosphorylation et la déacétylation de cibles communes telles PGC-1 α et FOXO, contribuant entre autres à l'augmentation de l'oxydation des acides gras et la biogénèse de la mitochondrie (*Ruderman et al, 2010*).

Dans la cellule β pancréatique, l'AMPK est active à une concentration physiologique de glucose (environ 5,5 mM) mais est rapidement inhibée lorsque la concentration intracellulaire de glucose augmente (*Leclerc et Rutter, 2004*). De plus, à bas glucose, l'activation de l'AMPK cause la phosphorylation de l'ACC1 et ACC2, contribuant à une diminution des concentrations de malonyl-CoA et à l'oxydation des acides gras (*da Silva Xavier et al, 2003*). Cependant, l'implication de l'AMPK dans la régulation de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose à des doses physiologiques est un sujet de vifs débats dans la littérature. Plusieurs études utilisant soit un inhibiteur pharmacologique de l'AMPK (AICAR) (*da Silva Xavier et al, 2003*), une invalidation génétique ubiquitaires ou spécifiques à la cellule β des sous-unités $\alpha 1$ ou $\alpha 2$ d'AMPK (*Sun et al, 2010a*), ou la surexpression de formes constitutivement actives (AMPK-CA) ou dominantes-négatives d'AMPK (AMPK-DN) (*da Silva Xavier et al, 2003*), démontrent que l'activation d'AMPK corrèle avec une inhibition de la sécrétion d'insuline induite par le glucose. D'un autre côté, d'autres études utilisant des approches similaires (activation d'AMPK par AICAR (*Wang et al, 2005; Gleason et al, 2007*) ou invalidation d'AMPK ubiquitaire ou spécifique à la cellule β (*Beall et al, 2010*)) démontrent que l'activation de l'AMPK serait associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Par ailleurs, deux études portant sur l'invalidation génétique de la kinase LKB1 démontrent une association entre la perte de l'activité kinase, l'inactivation d'AMPK et l'augmentation de la sécrétion d'insuline (*Fu et al, 2009; Sun et al, 2010b*). De plus, ces études démontrent que l'invalidation de LKB1 entraîne une augmentation de la masse des cellules β , mais il n'est pas certain que cet effet soit directement lié à l'activité d'AMPK, puisque LKB1 active 12 autres protéines. Cette confusion dans la littérature vient probablement du fait que l'AMPK contrôle des centaines de gènes et protéines et que des changements de son expression à long terme ne peuvent mener à des effets spécifiques et concluants en ce qui a trait à la sécrétion de l'insuline.

En résumé, nous proposons que la diminution des niveaux de malonyl-CoA par l'AMPK prévient le métabolisme des acides gras par le cycle TG/FFA, et donc diminuerait la génération de molécules signalétiques lipidiques potentialisatrices de la sécrétion

d'insuline. De plus, l'activation de l'AMPK étant associée à une diminution de la lipolyse, entre autres causée par la phosphorylation inhibitrice de la lipase HSL (*Daval et al*, 2005; *Wang et al*, 2008), la génération de molécule lipidiques signalétiques est d'autant plus diminuée. Il serait donc attendu que l'activation d'AMPK contribue à l'inhibition de la sécrétion d'insuline. Cependant, les voies moléculaires impliquées dans cette régulation sont encore mal comprises et font l'objet de plusieurs études.

Chapitre 5. Mise en contexte de la thèse

5.1 Problématique générale

Le DT2 est une maladie métabolique complexe causée par des facteurs génétiques mais aussi environnementaux, tels la sédentarité et le surpoids. Il est causé par la résistance des tissus cible à l'action de l'insuline en conjonction avec la dysfonction de la cellule β pancréatique. Cette dysfonction est d'ailleurs considérée comme l'élément déterminant dans le développement du DT2. Notre laboratoire s'intéresse à la sécrétion d'insuline par la cellule β et aux mécanismes qui la contrôle. La cellule β pancréatique du pancréas est source principale d'insuline de l'organisme, et la sécrétion est induite principalement en réponse au glucose, mais aussi à d'autres nutriments, tels les acides gras. Le métabolisme du glucose entraîne la dépolarisation de la membrane plasmique causant un influx de calcium responsable de l'exocytose des granules d'insuline. Notre laboratoire a montré l'existence d'une voie d'amplification par laquelle, à glucose élevé et en présence d'acides gras, l'augmentation de la concentration d'un FCM, le malonyl-CoA, diminue l'oxydation des acides gras, ceux-ci étant redirigés vers des voies d'estérification, menant à la production de molécules signalétiques lipidiques importantes pour la sécrétion d'insuline.

Alors que notre connaissance des systèmes de transduction métaboliques responsables de la stimulation de la sécrétion en réponse aux nutriments calorigéniques est assez avancée, la connaissance des processus de transduction métaboliques inhibiteurs de la sécrétion dans des contextes normaux ou pathologiques sont moins bien compris. Plusieurs mécanismes du corps humain ont pour fonction de limiter la sécrétion d'insuline et en voici quelques exemples. Tout d'abord, le pancréas est un organe innervé par le système nerveux sympathique (SNS) et parasympathique (SNP), et ses terminaisons nerveuses régulent la sécrétion des différentes hormones des îlots de Langerhans. La stimulation par le SNP est associée à une augmentation de la sécrétion d'insuline. Inversement, la stimulation par le SNS inhibe la sécrétion d'insuline, et survient rapidement à la suite d'un repas afin d'effectuer un ajustement rapide de la sécrétion et de prévenir l'hypoglycémie (*Lee et al,*

2010). Ensuite, l'hormone de stress, l'adrénaline, a une action hyperglycémiant et inhibe la sécrétion d'insuline. Enfin, la somatostatine, une hormone sécrétée par les cellules δ de l'îlot en réponse au glucose, vient de façon paracrine inhiber la sécrétion d'insuline afin de prévenir une sécrétion trop abondante d'insuline ce qui pourrait entraîner une hypoglycémie (*Hauge-Evans et al*, 2009). Cependant, nous pensons qu'il existe à l'intérieur même de la cellule β des processus métaboliques, comme par exemple lors du jeûne, qui préviennent une sécrétion d'insuline trop abondante. L'hypersécrétion pourrait donner lieu à des épisodes d'hypoglycémie et entraîner un manque de glucose au cerveau, de la confusion et éventuellement des convulsions et le coma (*CDA*, 2008). Nous croyons qu'en plus de limiter l'amplitude de la sécrétion, certains mécanismes purement métaboliques peuvent, de façon similaire à l'action de la somatostatine, limiter la durée de la sécrétion. Ceci est d'autant plus important dans un contexte de pré-diabète où l'abondance de nutriments liée à l'obésité, entre autres les acides gras, donne lieu à une sur-stimulation de la cellule β . Les mécanismes de régulation négative de la sécrétion viendraient ainsi contrôler la sécrétion et permettraient d'éviter l'épuisement de la cellule β . Les travaux de cette thèse de doctorat ont donc porté sur l'identification de quelques-uns de ces systèmes de transduction métaboliques de régulation négative de la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique, et ce en situation normale ou pathologique en lien avec le DT2.

5.2 Hypothèses

- SCHAD est une enzyme mitochondriale impliquée dans l'oxydation des acides gras à chaîne courte. Des mutations diminuant son activité chez l'homme causent une hyperinsulinémie hypoglycémiant (*Clayton et al*, 2001; *Eaton et al*, 2003; *Molven et al*, 2004). Nous proposons que SCHAD soit une enzyme qui régule de façon négative la sécrétion d'insuline en réponse aux nutriments calorigéniques (glucose, glutamine et leucine, acide gras), et ceci par la modulation des concentrations d'acides gras ou leur dérivés tels les acyl-CoA ou acyl-carnitine dans la cellule β .

- Notre laboratoire a démontré que l'exposition chronique des cellules β aux acides gras saturés altère la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG) (*Prentki et al*, 2002; *El-Assaad*, 2010). De plus, ces études ont révélé que l'altération du flux à travers le cycle TG/FFA cause une diminution de la SIIG (*Peyot et al*, 2009). Nous proposons que l'exposition prolongée de souris à une diète riche en gras active certaines voies métaboliques et signalétiques assurant une régulation négative de la sécrétion d'insuline et contribue au développement du DT2.

5.3 Objectif général

Identifier des voies métaboliques et signalétiques responsables de la régulation négative de la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique, et ceci dans un contexte normal et pathologique.

5.4 Objectifs spécifiques

- Tout d'abord *in vitro*, élucider le mécanisme par lequel une protéine importante dans l'oxydation des acides gras, SCHAD (*short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase*), régule de façon négative la sécrétion d'insuline et déterminer quels facteurs de couplage métaboliques sont impliqués.
- Ensuite, *ex vivo*, identifier des voies métaboliques et signalétiques importantes pour la régulation négative de la sécrétion d'insuline dans un modèle pathologique de DT2 induit par la diète (DIO) où la SIIG est diminuée.

5.5 Publications

Les travaux effectués durant mon doctorat ont donné lieu à un premier article scientifique publié dans la revue *Journal of Diabetes* duquel je suis l'auteure principale et un second article publié dans la revue *Diabetes* duquel je suis la deuxième auteure. De plus, cette thèse contient un troisième manuscrit qui est la suite de la publication dans *Diabetes*, duquel je suis l'auteure principale.

Pepin E, Guay C, Delghingaro-Augusto V, Joly E, Madiraju SR, Prentki M. Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a negative regulator of insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli in INS832/13 beta-cells. *Journal of diabetes*. 2010 Sep;2(3):157-67.

Peyot ML, **Pepin E**, Lamontagne J, Latour MG, Zarrouki B, Lussier R, Pineda M, Jetton TL, Madiraju SR, Joly E, Prentki M. Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes*. 2010 Sep;59(9):2178-87.

Pepin É, Peyot ML, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, Madiraju SMR, Joly E, Prentki M. Pancreatic β -cell dysfunction in a stratified model of diet-induced obesity: study of the role of AMP-kinase, protein kinase C ϵ and mitochondrial metabolism. Article en préparation pour soumission à la revue *Diabetes, obesity and metabolism*.

Chapitre 6. Résultats

Mise en contexte de l'article 1

La cellule β pancréatique sécrète l'insuline en réponse au métabolisme des nutriments tels le glucose ou les acides gras. Le métabolisme du glucose entraîne l'augmentation du ratio ATP/ADP, conduisant à la dépolarisation de la membrane plasmique, à l'élévation du Ca^{+2} cytoplasmique et à l'exocytose des granules d'insuline (Ashcroft et Rorsman, 1990). De plus, alors que l'élévation chronique du glucose et des acides gras est nuisible à la fonction de la cellule β , l'exposition de courte durée aux acides gras stimule la sécrétion d'insuline (Prentki et al, 2002; Leung et al, 2004). Une des molécules située au confluent du métabolisme du glucose et des acides gras est le malonyl-CoA, généré en présence de concentrations élevées de glucose, qui inhibe l'oxydation des acyl-CoA à chaîne longue et stimule la synthèse de molécules lipidiques complexes stimulatrices de la sécrétion. Des études ont aussi démontré l'effet bénéfique des acyl-CoA à chaîne courte sur la SIIG (MacDonald et al, 2008).

L'hyperinsulinémie est caractéristique d'une phase pré-diabétique chez un individu obèse afin de compenser l'insulinorésistance des tissus périphériques causée par l'augmentation des niveaux circulants d'acide gras. L'hyperinsulinémie peut aussi être causée par des mutations génétiques des enzymes glucokinase, GDH, et nouvellement de la *short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase* (SCHAD) (Eaton et al, 2003). SCHAD catalyse la troisième réaction de l'oxydation des acides gras à chaîne courte, et son expression est particulièrement élevée dans la cellule β pancréatique. La mutation génétique de cette enzyme cause chez le patient une hyperinsulinémie hypoglycémiante caractérisée par l'accumulation de deux types d'acide gras à chaîne courte, le L-3-hydroxybutyryl-carnitine dans le sang, et le L-3-hydroxyglutarate dans l'urine. Alors que certains patients pré-diabétiques sont hyperinsulinémiques afin de compenser la résistance croissante à l'action de l'insuline, les patients dont l'hyperinsulinémie est due à une mutation de SCHAD ne sont pas résistants à l'insuline.

Au début du présent projet, aucune étude n'avait été publiée portant sur le mécanisme par lequel SCHAD régule la sécrétion d'insuline. Nous avons donc entrepris de comprendre ce mécanisme en reproduisant *in vitro* la perte d'activité de SCHAD, observée chez les patients. Nous avons donc diminué l'expression de SCHAD par siRNA et shRNA dans la lignée de cellule β pancréatiques INS832/13. Nous avons mesuré plusieurs paramètres influençant la sécrétion d'insuline, dont l'effet de la stimulation à des concentrations élevées de glucose, d'acides gras ou d'acides aminés, puis l'entrée de calcium dans la cellule suite à une stimulation au glucose. Nous avons ensuite mesuré l'effet de la diminution d'expression de SCHAD sur l'oxydation d'acide gras à chaîne longue ou moyenne. Afin de disséquer le mécanisme d'action de SCHAD, nous avons mesuré la sécrétion d'insuline des cellules SCHAD déficientes en présence de carnitine, une molécule assurant le transport des acides gras entre la mitochondrie et le cytoplasme, ainsi qu'en utilisant un inhibiteur général des TA, l'aminooxyacétate.

Au cours de mon projet, deux publications portant sur cette même question ont été publiées. La première étude démontre que la diminution d'activité de l'enzyme induite par siRNA dans la lignée cellulaire INS832/13 et dans les îlots pancréatiques de souris cause une augmentation de la sécrétion basale, sans modification de la SIIG (*Hardy et al*, 2007). La deuxième étude, utilisant la même lignée cellulaire et des îlots pancréatiques de rats, montre une augmentation de la SIIG induite par l'absence de SCHAD sans que l'oxydation du glucose ou des acides gras ne soit altérée (*Martens et al*, 2007). La confrontation de ces résultats avec ceux obtenus dans notre laboratoire sera abordée dans la discussion.

Article 1

Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a negative regulator of insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli in INS832/13 β -cells

Émilie Pepin, Claudiane Guay, Viviane Delghingaro-Augusto, Erik Joly, S. R. Murthy Madiraju, Marc Prentki

Montreal Diabetes Research Center (MDRC), the Centre de recherche du CHUM, Molecular Biology program, Departments of nutrition and biochemistry, University of Montreal, Montreal, Canada

Titre abrégé: HADHSC and insulin secretion.

Publication: *Journal of Diabetes* 2010, 2, 157-167.

Contribution des co-auteurs:

E.Pepin a effectué la majorité des expériences et l'analyse des résultats, a contribué à l'élaboration du projet et à la rédaction du manuscrit.

C. Guay a mis au point la transfection par nucléofector dans les cellules INS832/13 et a contribué aux expériences nécessitant une transfection.

V. Delghingaro-Augusto a effectué les expériences relatives au rats ZDF.

E. Joly a contribué à l'analyse des résultats et à l'écriture du manuscrit.

S.R.M. Madiraju a collaboré à l'élaboration du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

M. Prentki a contribué à l'élaboration du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a negative regulator of insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli in INS832/13 β -cells

Émilie PEPIN^{1,2}, Claudiane GUAY^{1,2}, Viviane DELGHINGARO-AUGUSTO¹, Erik JOLY¹, S. R. Murthy MADIRAJU¹, Marc PRENTKI^{1,3}

¹Montreal Diabetes Research Center & CRCHUM, 2901 Rachel E, Montréal Québec H1W 4A4, Canada; ²Program of Molecular Biology, University of Montréal, Montréal, Canada; ³Departments of Nutrition and Biochemistry, University of Montréal, Montréal, Canada

Short title: HADHSC and insulin secretion

Corresponding author

Dr. S.R. Murthy Madiraju

Montreal Diabetes Research Center, CRCHUM, site Angus

2901 Rachel Street East, Rm 308

Montreal, QC H1W 4A4, Canada.

Phone: 1-514-890-8000 # 23610. Fax: 1-514-412-7648.

Abstract

Background: Hyperinsulinemia associated with non-ketotic hypoglycemia is observed in patients with mutated β -oxidation enzyme short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADHSC). We investigated the mechanism underlying HADHSC-mediated regulation of insulin secretion. **Methods:** Knockdown of HADHSC expression by RNAi in INS832/13 β -cells was performed using shRNA and siRNA. **Results:** HADHSC-knockdown increased both fuel- (glucose or leucine plus glutamine) and non-fuel- (high KCl) induced secretion. The enhancement of glucose stimulated insulin secretion (GSIS) by HADHSC-knockdown was independent of changes in cytosolic Ca^{2+} and also occurred in the presence of fatty acids. L-carnitine, which is used for the formation of acyl-carnitine compounds, increased GSIS in control cells, whereas it was unable to further increase the augmented GSIS in HADHSC knockdown cells. The pan transaminase inhibitor aminooxyacetate reversed HADHSC knockdown-mediated increase in GSIS. $[1-^{14}\text{C}]$ -palmitate or -octanoate oxidations were not reduced in HADHSC knockdown cells. L-3-hydroxybutyryl-carnitine (tested using its precursor L-3-hydroxybutyrate) and L-3-hydroxyglutarate that accumulates in the blood and urine, respectively, of HADHSC deficient patients did not change insulin secretion. **Conclusion:** 1) HADHSC is a negative regulator of insulin secretion promoted by both fuel and non fuel stimuli; 2) enhanced secretion upon HADHSC knockdown is not a consequence of fatty acid oxidation inhibition causing the accumulation of long-chain fatty acids or their CoA derivatives; 3) L-3-hydroxybutyrate and L-3-hydroxyglutarate do not mediate enhanced secretion caused by reduced HADHSC activity; 4) transamination reaction(s) and the formation of short chain acylcarnitines and -CoAs may be implicated in the mechanism whereby HADHSC deficiency results in enhanced insulin secretion and hyperinsulinemia.

Key words: Hyperinsulinemia, insulin secretion, pancreatic β -cell, short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain acyl-CoA, transamination.

Introduction

Insulin secretion by the pancreatic β -cells involves fuel metabolism mediated signal transduction systems. Even though the precise nature of these signals is not well defined, they include a rise in cytosolic ATP/ADP, which closes K_{ATP} channels leading to β -cell depolarization with eventual rise in cytosolic Ca^{2+} promoting secretion^{1, 2}. However, glucose stimulated insulin secretion (GSIS) occurs under conditions where K_{ATP} channels are by-passed, provided that Ca^{2+} is elevated^{3, 4}. The nature of these “ K_{ATP} -independent” amplification pathways implicated in fuel signaling is uncertain, but likely involves anaplerotic reactions that supply Krebs cycle intermediates¹. Anaplerosis causes an elevation in citrate, a key metabolite implicated in pyruvate cycling processes, in particular the pyruvate/citrate shuttle^{5, 6} which contributes to the production of cytosolic malonyl-CoA and NADPH, two candidate metabolic coupling factors⁷. GSIS is associated with alterations in the acyl-CoA profile of β -cells, with one of the earliest change occurring in malonyl-CoA⁸⁻¹¹. The malonyl-CoA/carnitine palmitoyltransferase-I metabolic signaling network is thought to play an important role in β -cell fuel signaling via accumulation of various lipid molecules such as fatty acyl-CoA and diacylglycerol⁸⁻¹¹. Biochemical evidence also indicated that various short-chain acyl-CoA compounds play a role in GSIS¹².

Although chronically elevated free fatty acids (FFA) along with high glucose are detrimental to β -cell function¹³⁻¹⁵, short-term supply of FFA to β -cells is essential for proper GSIS¹⁶. Association of excess adiposity with elevated circulating FFA accompanied by insulin resistance and compensating hyperinsulinemia has been well documented. Also, non-ketotic and hypoglycaemic hyperinsulinemia has been described in patients with genetic deficiencies of short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (HADHSC)¹⁷⁻¹⁹, subunits of the K_{ATP} -channel²⁰ or gain-of-function mutations in glucokinase or glutamate dehydrogenase²⁰. In addition, a functional deficiency of Foxa2, which controls the expression of HADHSC, the sulfonylurea receptor SUR1 and the K^+ channel KIR6.2, causes persistent hyperinsulinemia²¹.

HADHSC catalyzes the penultimate reaction in the mitochondrial β -oxidation, i.e. the NAD^+ -dependent oxidation of short-chain 3-hydroxyacyl-CoA to the corresponding 3-oxoacyl-CoA²². HADHSC is expressed in most tissues, and its activity is particularly high in β -cells^{23, 24}. Genetic deficiency of HADHSC is associated with elevated (4-10 fold higher) plasma insulin levels, enhanced excretion of L-3-hydroxyglutarate in the urine and increased L-3-hydroxybutyrylcarnitine in the blood¹⁷⁻¹⁹. Recent studies revealed that RNAi-suppression of HADHSC expression in insulinoma cells and mouse islets leads to elevated basal insulin secretion without altered GSIS in a K_{ATP} channel independent manner²⁵. In INS832/13 cells and isolated rat β -cells, RNAi-knockdown of HADHSC expression caused elevated insulin secretion both at low and high glucose, and this was not associated with altered glucose or FFA oxidation²⁴. Even though the exact mechanism of increased insulin secretion in the absence of HADHSC is not clear, it was proposed that HADHSC plays a role in the control of the β -cell redox state that regulates insulin secretion²⁴.

In the present paper we demonstrate that knockdown of HADHSC in INS832/13 β -cells enhances insulin secretion stimulated by fuels (glucose, leucine plus glutamine) and non-fuel stimulus (elevated KCl). HADHSC knockdown mediated increase in GSIS is not associated with enhanced Ca^{2+} influx or altered ATP levels. We provide evidence for the involvement of transaminase and carnitine-dependent steps in HADHSC deficiency mediated elevation in insulin secretion.

Methods

Materials

Cell culture supplies were from Corning (Corning, NY) and Fisherbrand (Nepean, ON, Canada). Palmitate sodium salt was obtained from Nu-Check Prep (Elysian, MN). HADHSC polyclonal antibody was purchased from GenWay (San Diego, CA). Amaxa nucleofactor kit was from Lonza Cologne AG (Cologne, Germany). pSilencerTM-U6 2.0

cloning vector was from Ambion® (Austin, Tx). siRNA (Trifecta kit) were designed and synthesized by Integrated DNA Technologies, Inc (IA, USA). All chemicals were from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO) unless specified. Protein assay was done using the BCA kit (Pierce).

Cell culture

INS832/13 cells²⁶ (passages 52-63) were cultured as described⁶. Cells were seeded in 75 cm² flasks at a density of 4x10⁶ cells/flask 2 days prior to transfection and were used at 60-70% confluence. Non-transfected cells were plated in 12-well plates at a density of 2 x10⁵ cells/well 3 days prior to experiment for insulin secretion.

Short-hairpin RNA (shRNA) and small-interfering RNA (siRNA) gene silencing

shRNA directed against HADHSC (GenBankTM accession number NM_057186) were designed as described elsewhere⁶. Out of four designed shRNA-HADHSC constructs, the one with the most efficient HADHSC protein knockdown was chosen for subsequent experiments. An empty vector and a scrambled construct were used as controls. The sense strand for the selected HADHSC shRNA was 5'-GATCCGCACC GATGACCAGCCAGAATTCAAGAGATTCTGGCTGGTCATCGGTGTTTTTTGGAAA-3' and 5'-GATCCGTCTGAACCGTTTCGGCAGATTCAAGAGATCTGCCGAACGGT-CAGACTTTTTTTGGAAA-3' for the scrambled control. A combination of two siRNA (cat. # RNC.RNAI.N057186.3.3 and RNC.RNAI.N057186.3.1) was used for maximal knockdown of HADHSC protein. A combination of two scrambled (Scr) siRNA was used as control. Scr control 1 and 2 sense strands were 5'-Phos-rArUrGrCrArArGrUrGrGrArAr-GrCrGrArGrArCrCrArCrCAC-3' and 5'-Phos-rArUrGrUrGrUrGrArArCrUrGrArArCrUrUrCrGrArUr-CrUrU-3', respectively.

Cell transfection

shRNA or siRNA were introduced into INS832/13 cells with Amaxa Nucleofactor using solution V. A ratio of 5 µg nucleic acid (siRNA 480 nM or shRNA 0.5 µg + 4.5 µg carrier plasmid DNA pBluescript) for 6x10⁶ cells was used. Transfected cells were plated at a density of 3.5 x 10⁵ cells/well in 12-well plates for insulin secretion and at 2 x 10⁶ cells/T25

flasks for fatty acid oxidation. Experiments were performed 72 h post-transfection, where HADHSC knockdown was found to be maximal.

Insulin secretion

siRNA- or shRNA-transfected cells were starved for 2 h in RPMI complete medium at 1 mM glucose and preincubated for 1 h in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mM HEPES (KRBH, pH 7.4), 0.5% BSA and 1 mM glucose. Cells were then incubated for 1 h in KRBH containing 0.5% BSA and fuel secretagogues (1, 5, or 11 mM glucose, in the absence or presence of 0.3 mM BSA-coupled palmitate, or a mixture of 5 mM L-leucine plus 5 mM L-glutamine) or 1 mM glucose + 35 mM KCl. Where indicated, siRNA-transfected INS832/13 cells were incubated as mentioned above with 1 mM L-carnitine or 2 mM aminooxyacetate. The effect of cell-permeant L-3-hydroxybutyrate and L-3-hydroxyglutarate (methyl-esters) was examined in non-transfected INS832/13 cells. At the end of the 1h incubation the media were collected to measure insulin release. Cells were harvested with acid-ethanol to measure total insulin content (TIC), urea lysis buffer for protein content or SDS/Triton lysis buffer for western blotting as previously described⁶. Insulin release and TIC were measured by radioimmunoassay (RIA) (Linco Research, St. Charles, MO) using a human insulin standard (Sigma-Aldrich).

Immunoblot analysis

Proteins solubilized with SDS/Triton lysis buffer (15 µg) were resolved on a 10% acrylamide gel and transferred to a nitrocellulose membrane (Whatman, Hahnstrabe, Dassel, Germany). Blots were probed using polyclonal chicken-anti-HADHSC and rabbit-anti-tubulin antibodies (Abcam inc., Cambridge, MA, USA) according to supplier's protocol. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit-anti-chicken IgG (GenWay, San Diego, CA) and horseradish peroxidase-conjugated goat-anti-rabbit IgG (Biorad, Hercules, CA) were used as secondary antibodies. HADHSC and tubulin protein bands were visualized using SuperSignal West Pico chemiluminescence kit (Pierce).

Fatty acid oxidation

siRNA-transfected INS832/13 cells, starved and preincubated as described for insulin secretion, were incubated for 1h in KRBH, 0.3 mM [1-¹⁴C]-palmitate or [1-¹⁴C]-octanoate

(both at 0.1 μ Ci/mL), 0.5% defatted BSA, 1 mM L-carnitine, at 1, 5, or 11 mM glucose. Measurement of β -oxidation was done as described elsewhere²⁷.

Real time quantitative PCR analysis

Total mRNA extraction and cDNA synthesis from Zucker Lean (ZL) and Zucker Fatty (ZF) rat islets were performed as previously described²⁸. Primers for rat HADHSC and cyclophilin were: HADHSC forward: 5'-AAGAGAGCCTTAAGAGAATGG-3'; HADHSC reverse: 5'-AGCTCATTCTTCAACTTCAGG-3'; cyclophilin forward: 5'-CTTGCTGCAGACATGGTCAAC-3'; cyclophilin reverse: 5'-GCCATTATGGCGTGTGAAGTC-3'. Real time quantitative PCR were performed on Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research, Mortlake, Australia) using Quantitech Sybrgreen (Quiagen, CA).

ATP measurements

siRNA-transfected INS832/13 cells were starved and preincubated as described for insulin secretion. ATP measurement was done using the ATPlike kit (PerkinElmer, Boston, MA) following a 10 min incubation in KRBH, 0.5% BSA and 1, 5 or 11 mM glucose.

Cytosolic Ca²⁺ measurement

Ca²⁺ was measured using a similar procedure as previously described²⁹. Briefly, siRNA-transfected INS832/13 cells were plated at a density of 1×10^6 cells per 42 mm coverslip and incubated at 37 °C for 72h in complete medium at 11 mM glucose. Cells were starved in RPMI complete medium at 1 mM glucose for 2h and loaded in KRBH containing 1mM glucose, 1% BSA (defatted), 2.5 mM probenidol, 0.2 mM sulfinpyrazone and 6 μ M Fluo-4AM + pluronic F-127 (1:1) (Invitrogen, CA, USA) for 75 min at 37 °C. Coverslips were then mounted in a closed perfusion chamber (H. Saur, Germany) and cells perfused with KRBH containing 1% BSA, 2.5 mM probenidol, 0.2 mM sulfinpyrazone and 1 mM glucose or 11 mM glucose or 1mM glucose + 35 mM KCl using a syringe pump (New Era pump system). The microscope, perfusion chamber and solutions were maintained at 37°C. Cells were incubated for 180s at 1 mM glucose and one image was recorded for baseline determination. Images were then recorded every second for a period of 10 min in presence of 11 mM glucose, and for a period of 2 min in presence of KCl using a Leica TCS SP5

inverted confocal microscope. For each transfection condition, 130 cells were randomly chosen for fluorescence measurement. Incubation with 11mM glucose was started at time 20s, but the analyses were started at 150s to exclude baseline fluctuations (caused by the autofocus stabilization device of the microscope scanner and false-positive fluorescence due to osmolarity changes in the perfusion chamber).

Statistical analysis

Data are expressed as means \pm SEM. Statistical significance was calculated with the unpaired two-tailed Student's *t* test or two-way ANOVA with appropriate post-hoc test. Statistical analyses were performed using InStat program (GraphPad Software, San Diego, CA).

Results

RNAi-mediated knockdown of HADHSC increases fuel and non-fuel induced insulin secretion.

We transfected INS832/13 β -cells with either HADHSC shRNA or siRNA to knockdown this enzyme. Compared to the mock- and scrambled-transfected cells (Scr-Control), HADHSC-directed shRNA or siRNA (shRNA-HADHSC or siRNA-HADHSC) transfected cells showed 80% reduction of HADHSC protein expression (Fig. 1A). Insulin secretion in response to glucose and KCl were performed using both mock transfection (vector only) and scrambled RNA as controls. As both controls showed similar GSIS, only scrambled control is shown.

In the absence of FFA, HADHSC knockdown either by shRNA or by siRNA led to an increase in insulin secretion, stimulated by glucose or by KCl (Fig. 1B, C). The siRNA were relatively more efficient in decreasing HADHSC protein levels and in increasing insulin secretion at 5 and 11 mM glucose and at 1 mM glucose + 35 mM KCl (Fig. 1C). Palmitate augmented GSIS and had no effect on the enhancement of insulin secretion by HADHSC knockdown (Fig. 1B, C). The increased GSIS is in accordance with that reported earlier²⁴. The data show in addition, that HADHSC knockdown also enhances secretion

promoted by a non-fuel stimulus (KCl) and that the elevated GSIS is observed both in the absence and presence of exogenous FFA, without any change in insulin content (Fig. 1E). It has been suggested that the elevated urinary 3-hydroxyglutarate observed in hyperinsulinemic patients with HADHSC deficiency could originate from amino acid metabolism¹⁹. We tested whether HADHSC downregulation alters secretion stimulated by leucine plus glutamine. HADHSC siRNA-transfected cells showed a 2-fold amplification of insulin secretion in response to leucine plus glutamine (Fig. 1D).

Intracellular Ca^{2+} and ATP are unchanged by HADHSC downregulation.

Since Ca^{2+} influx³⁰ is essential for GSIS, we examined whether HADHSC knockdown alters cytoplasmic Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). There was no difference in the increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ between the scr control and the HADHSC-siRNA transfected cells following elevated glucose or KCl stimulation (Fig. 2). Total cellular ATP content in HADHSC-deficient cells at 1, 5 and 11 mM glucose (1.03 ± 0.13 ; 1.13 ± 0.14 & 1.15 ± 0.15 , respectively) was similar to that of the control scr-siRNA cells (0.93 ± 0.12 ; 1.09 ± 0.13 & 1.04 ± 0.13 at 1, 5 & 11 mM glucose, respectively).

Lack of effect of L-3-hydroxybutyrate and L-3-hydroxyglutarate on insulin secretion.

One of the clinical manifestations in patients bearing a loss of function HADHSC mutation is the accumulation of short-chain fatty acid derivatives, L-3-hydroxybutyryl-carnitine in the blood and L-3-hydroxyglutarate in the urine^{17, 19, 31}. We investigated the possibility that these metabolites may contribute to the increased insulin secretion seen in the absence of HADHSC. When INS832/13 cells were incubated with the cell-permeant methyl esters of either L-3-hydroxybutyrate or L-3-hydroxyglutarate in the absence or presence of palmitate, in concentrations reflecting the accumulation of the metabolites in the blood of some patients¹⁷, no potentiation of GSIS was discernable (Fig. 3A, B).

Effect of HADHSC deficiency on fatty acid β -oxidation.

In accordance with previous work²⁴, we observed no alteration in $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ -palmitic acid oxidation due to HADHSC knockdown (Fig. 4A). However, considering that HADHSC is specific for short to medium-chain hydroxyacyl-CoAs and that palmitate used in these experiments was labelled only at the first carbon, only the first of eight rounds of β -

oxidation was measured, which may not reflect a defect in HADHSC activity. Therefore, we examined the effect of HADHSC knockdown on the β -oxidation of [1- 14 C]-octanoic acid. Unlike the β -oxidation of palmitic acid, octanoic acid oxidation is not inhibited by high concentrations of glucose. Thus, octanoic acid entry in to mitochondria is not controlled by glucose-derived malonyl-CoA that inhibits carnitine palmitoyltransferase-1, the limiting enzyme in the β -oxidation of long chain FA. Surprisingly, β -oxidation of octanoic acid, measured as $^{14}\text{CO}_2$ production, showed a tendency to increase in cells with HADHSC knockdown, though statistically significant difference was seen only at 5 mM glucose (Fig. 4B). The oxidation of other [1- 14 C]-labeled medium chain FA was not tested due to their unavailability.

Transaminase activity is required for the amplified GSIS induced by HADHSC knockdown.

Short-chain acyl-CoA esters were shown to inhibit the activity of α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDH) in the brain^{32, 33}. It can be hypothesized that knockdown of HADHSC activity could lead to the accumulation of short-chain acyl-CoAs, with the resultant inhibition of α -KGDH and efflux of α -KG from mitochondria, used in transamination reactions (see also Fig 8).

To test the involvement of this pathway, we examined the effect of aminooxyacetate, a general transaminase inhibitor. At all glucose concentrations, aminooxyacetate had no significant effect on insulin secretion in control cells, whereas, HADHSC-knockdown-induced elevation in GSIS was suppressed by the drug (Fig. 5).

Effect of L-carnitine on GSIS in HADHSC deficient cells.

Since L-3-hydroxybutyrylcarnitine accumulates in the blood of HADHSC deficient patients^{17, 19, 31}, and also as it was noticed that short-chain acyl-CoAs accumulate in cells with HADHSC-knockdown²⁴, we tested the possibility that acylcarnitine formation is important for the elevated GSIS in HADHSC-knockdown cells. L-carnitine increased GSIS in control cells, to the extent seen in cells with HADHSC-knockdown; however, there was no further increase in GSIS by carnitine in cells with HADHSC-knockdown (Fig. 6).

HADHSC expression in hyperinsulinemic Zucker Fatty rat islets.

The Zucker Fatty (ZF) rat is a model of obese normoglycemic hyperinsulinemia, caused by mutation in the leptin receptor³⁴. We examined the possibility that altered HADHSC levels in islets of ZF rats may contribute to their hyperinsulinemia. Islets from ZF rats showed a 40% reduction in HADHSC mRNA levels in comparison to Zucker Lean controls (Fig. 7).

Discussion

The results show that elevated insulin secretion with HADHSC knockdown is not dependent on added FFA (as a substrate for β -oxidation or the synthesis of complex lipids), and occurs in response to either glucose or leucine plus glutamine. This suggests a role for this enzyme in the metabolism and signaling of other fuels besides fatty acids. Thus, significant quantities of acetoacetyl-CoA which can be generated in mitochondria of β -cells during amino acid and glucose metabolism^{8, 12, 35, 36}, can become a substrate for HADHSC (see Fig 8). Indeed, since the HADHSC reaction is reversible and because this enzyme is highly expressed in the β -cell versus other β -oxidation enzymes^{23, 24}, the possibility should be considered that upon glucose or leucine plus glutamine stimulation, the flux through HADHSC is in the direction of acetoacetyl-CoA to β -hydroxy-butyryl-CoA, and not the reverse related to fat oxidation. Thus, glucose or leucine plus glutamine stimulation might lead in the absence of HADHSC to enhanced production of acetoacetyl-CoA which has been proposed to be the precursor of short chain acyl-CoA compounds promoting insulin secretion^{12, 37}. Interestingly, KCl-stimulated insulin secretion was also enhanced by HADHSC knockdown. These results collectively indicate that HADHSC controls the intramitochondrial generation of a metabolite, the levels of which increases when HADHSC activity is suppressed, resulting in augmented insulin secretion by all type of stimuli (fuel and non-fuel). The possibility of elevated Ca^{2+} influx in HADHSC deficient cells as a contributing factor for the observed increase in GSIS is eliminated inasmuch as

there are no differences in the amplitude of ($[Ca^{2+}]_i$) between Scr-siRNA and HADHSC-siRNA cells. The role for Ca^{2+} influx is also ruled-out by the results showing increased KCl-stimulated insulin secretion following HDASC knockdown, where Ca^{2+} influx is not limiting. Similarly, changes in cellular ATP levels are also not responsible for the elevated GSIS due to HADHSC knockdown.

Clinical studies in HADHSC deficient patients revealed an increase in the blood levels of L-3-hydroxybutyrylcarnitine and urinary levels of L-3-hydroxyglutarate^{17, 19, 31}. What is the origin of these metabolites? It has been suggested that the L-enantiomer of 3-hydroxyglutarate arises from amino acid metabolism¹⁹. The origin of these L-enantiomers and whether their accumulation is related to a possible role of HADHSC in glucose or amino acid metabolism remains to be investigated. The accumulation of L-3-hydroxybutyrylcarnitine is in accordance with the possibility that much of the flux through HADHSC, at least at low FFA levels, occurs in the direction of hydroxyacyl-CoA formation and not dehydrogenation. Nonetheless, our results suggest that neither L-3-hydroxybutyrylcarnitine (formed intra-cellularly from L-3-hydroxybutyrate) nor L-3-hydroxyglutarate act as the metabolite(s) mediating accelerated insulin secretion upon HADHSC knockdown since both of them did not alter GSIS.

Besides these metabolites, lack of HADHSC might also result in mitochondrial accumulation of short-chain hydroxyacyl-CoAs which could inhibit KGDH³³ (Fig 8). Inhibition of KGDH should lead to a build-up and efflux of α -KG from mitochondria into cytosol, where it is transaminated to glutamate, which may re-enter mitochondria, to be oxidized by GDH to α -KG. The possible inhibition of KGDH upon HADHSC knockdown may also result in reduced GTP formation causing GDH activation. It is well documented that activating mutations of GDH result in hyperinsulinemia³⁸. Because of this and inasmuch as leucine plus glutamine-stimulated insulin secretion is also enhanced upon HADHSC knockdown, we examined the possible involvement of a transamination step in mediating the HADHSC effect on insulin secretion. Our results demonstrate that a global transaminase inhibitor, aminooxyacetate, brought the HADHSC-knockdown-induced elevated GSIS back to control levels, strongly supporting the view that a transaminase

reaction is critical in mediating the HADHSC-knockdown effect. Recent findings by Filling *et al* showing a physical interaction between HADHSC and GDH are consistent with this hypothesis³⁹.

Further investigation to identify the putative metabolic signal in HADHSC knockdown showed that although HADHSC takes part in β -oxidation, its knockdown in INS832/13 cells either has no effect on [1-¹⁴C]-palmitate oxidation or even slightly enhanced the oxidation of [1-¹⁴C]-octanoate. These seemingly surprising observations in fact can be explained by the preference of HADHSC for short- and medium-chain L-3-hydroxyacyl-CoA esters as substrates. Thus, during the oxidation of [1-¹⁴C]-palmitate, the first round of β -oxidation itself, which is not dependent on the activity of HADHSC, releases [¹⁴C]-acetyl-CoA, which is either fully oxidized to ¹⁴CO₂ or transformed to [¹⁴C]-labelled acid-soluble products, via the Krebs cycle. Because of the labelling at the first position only, there were no noticeable differences between control and HADHSC-knockdown cells in FFA oxidation. During [1-¹⁴C]-octanoate oxidation, the [1-¹⁴C]-3-hydroxyoctanoyl-CoA formed at the third step in the β -oxidation spiral is a substrate for both HADHSC and also long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, both eventually leading to hexanoyl-CoA formation. However, in the absence of active HADHSC, 3-hydroxyhexanoyl-CoA cannot be oxidized and probably leaves mitochondria as a carnitine ester, without re-entering β -oxidation spiral. Due to this the rate of [1-¹⁴C]-octanoate molecules that go through the first round of β -oxidation is slightly increased at least at intermediate glucose concentration (due to lack of competition between the unlabeled hexanoyl-CoA formed from [1-¹⁴C]-octanoate and the [1-¹⁴C]-octanoyl-CoA). Nonetheless, the fact that [1-¹⁴C]-palmitate or -octanoate oxidation was not reduced in HADHSC knockdown cells and that the effect on GSIS occurred also in the presence of exogenous FFA suggest that reduced HADHSC activity did not cause a buildup of long chain acyl-CoA or FFA in the β -cell leading to enhanced secretion.

L-carnitine stimulated GSIS, even in the absence of added FFA in control cells. However, carnitine could not further stimulate the elevated GSIS seen in INS832/13 cells with HADHSC-knockdown. These results suggest that (a), carnitine promotes the formation and

efflux of an acylcarnitine derivative from mitochondria into cytosol, where it stimulates insulin exocytosis, and that (b) this pathway is already activated in HADHSC-deficient INS832/13 cells and thus carnitine cannot further enhance insulin exocytosis in these cells. Thus, a short-chain acyl-CoA metabolite that accumulates and leaves mitochondria as a carnitine ester, might cause enhanced insulin secretion in HADHSC knockdown cells (Fig. 8).

Our investigation into the relevance of HADHSC activity/expression in the hyperinsulinemia associated with insulin resistance in the ZF rat model, revealed lowered mRNA levels of this enzyme in the pancreatic islets as compared to the ZL rat islets. This observation is compatible with the possible regulation of the activity/expression of HADHSC being important for enhancing insulin secretion in order to compensate for insulin resistance.

In conclusion, the results are compatible with the view that HADHSC activity is relevant not only for FA metabolism but also for glucose and amino acid metabolism in mitochondria. Also, the augmented insulin secretion seen in β -cells lacking active HADHSC is possibly due to the production of a metabolite in mitochondria (e.g., an acylcarnitine) and also activation of GDH. The results also suggest that in the β -cell: 1) HADHSC is a negative regulator of insulin secretion promoted by both fuel and non fuel stimuli; 2) enhanced secretion upon HADHSC knockdown is not a consequence of β -oxidation inhibition causing the accumulation of long chain FA or their CoA derivatives; 3) L-3-hydroxybutyrate and L-3-hydroxyglutarate do not mediate enhanced secretion caused by reduced HADHSC activity; 4) transamination reaction(s) and the formation of short chain acyl-carnitine and -CoA compounds are implicated in the mechanism whereby HADHSC deficiency results in enhanced insulin secretion and hyperinsulinemia.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Canadian Institute of Health Research and the Canadian Diabetes Association (to MP and MM). EP has received support from Diabète Québec and the Molecular Biology Department of Université de Montréal. MP holds the

Canada Research Chair in Diabetes and Metabolism. We thank Dr Marie-Line Peyot for helpful discussions.

Disclosure statement

The authors have nothing to disclose from a financial point of view. The authors state that the manuscript has never been published before and is not submitted elsewhere.

References

1. Prentki M. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *Eur J Endocrinol*. 1996 Mar;134(3):272-86.
2. Ashcroft FM, Rorsman P. ATP-sensitive K⁺ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochem Soc Trans*. 1990 Feb;18(1):109-11.
3. Aizawa T, Sato Y, Ishihara F, Taguchi N, Komatsu M, Suzuki N, et al. ATP-sensitive K⁺ channel-independent glucose action in rat pancreatic beta-cell. *Am J Physiol*. 1994 Mar;266(3 Pt 1):C622-7.
4. Gembal M, Gilon P, Henquin JC. Evidence that glucose can control insulin release independently from its action on ATP-sensitive K⁺ channels in mouse B cells. *J Clin Invest*. 1992 Apr;89(4):1288-95.
5. Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes*. 2000 May;49(5):718-26.
6. Guay C, Madiraju SR, Aumais A, Joly E, Prentki M. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 2007 Dec 7;282(49):35657-65.
7. Nolan CJ, Prentki M. The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2008 Oct;19(8):285-91.
8. Corkey BE, Glennon MC, Chen KS, Deeney JT, Matschinsky FM, Prentki M. A role for malonyl-CoA in glucose-stimulated insulin secretion from clonal pancreatic beta-cells. *J Biol Chem*. 1989 Dec 25;264(36):21608-12.
9. Wolf BA, Easom RA, McDaniel ML, Turk J. Diacylglycerol synthesis de novo from glucose by pancreatic islets isolated from rats and humans. *J Clin Invest*. 1990 Feb;85(2):482-90.
10. Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cystolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*. 1996 Mar;45(3):273-83.

11. Liang Y, Matschinsky FM. Content of CoA-esters in perfused rat islets stimulated by glucose and other fuels. *Diabetes*. 1991 Mar;40(3):327-33.
12. MacDonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Brown LJ, Hasan NM, Kendrick MA. Acetoacetate and beta-hydroxybutyrate in combination with other metabolites release insulin from INS-1 cells and provide clues about pathways in insulin secretion. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2008 Feb;294(2):C442-50.
13. Leung N, Sakaue T, Carpentier A, Uffelman K, Giacca A, Lewis GF. Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men. *Diabetologia*. 2004 Feb;47(2):204-13.
14. Unger RH, Orci L. Lipoapoptosis: its mechanism and its diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2-3):202-12.
15. Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*. 2002 Dec;51 Suppl 3:S405-13.
16. Stein DT, Esser V, Stevenson BE, Lane KE, Whiteside JH, Daniels MB, et al. Essentiality of circulating fatty acids for glucose-stimulated insulin secretion in the fasted rat. *J Clin Invest*. 1996 Jun 15;97(12):2728-35.
17. Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, et al. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *J Clin Invest*. 2001 Aug;108(3):457-65.
18. Eaton S, Chatziandreou I, Krywawych S, Pen S, Clayton PT, Hussain K. Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with hyperinsulinism: a novel glucose-fatty acid cycle? *Biochem Soc Trans*. 2003 Dec;31(Pt 6):1137-9.
19. Molven A, Matre GE, Duran M, Wanders RJ, Rishaug U, Njolstad PR, et al. Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes*. 2004 Jan;53(1):221-7.

20. Dunne MJ, Cosgrove KE, Shepherd RM, Aynsley-Green A, Lindley KJ. Hyperinsulinism in infancy: from basic science to clinical disease. *Physiol Rev.* 2004 Jan;84(1):239-75.
21. Lantz KA, Vatamaniuk MZ, Brestelli JE, Friedman JR, Matschinsky FM, Kaestner KH. Foxa2 regulates multiple pathways of insulin secretion. *J Clin Invest.* 2004 Aug;114(4):512-20.
22. Bartlett K, Eaton S. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem.* 2004 Feb;271(3):462-9.
23. Hammar H, Berne C. The activity of beta-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in the pancreatic islets of hyperglycaemic mice. *Diabetologia.* 1970 Oct;6(5):526-8.
24. Martens GA, Vervoort A, Van de Casteele M, Stange G, Hellemans K, Van Thi HV, et al. Specificity in beta cell expression of L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain, and potential role in down-regulating insulin release. *J Biol Chem.* 2007 Jul 20;282(29):21134-44.
25. Hardy OT, Hohmeier HE, Becker TC, Manduchi E, Doliba NM, Gupta RK, et al. Functional genomics of the beta-cell: short-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase regulates insulin secretion independent of K⁺ currents. *Mol Endocrinol.* 2007 Mar;21(3):765-73.
26. Hohmeier HE, Mulder H, Chen G, Henkel-Rieger R, Prentki M, Newgard CB. Isolation of INS-1-derived cell lines with robust ATP-sensitive K⁺ channel-dependent and -independent glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes.* 2000 Mar;49(3):424-30.
27. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, et al. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes.* 2004 Apr;53(4):1007-19.
28. Delghingaro-Augusto V, Nolan CJ, Gupta D, Jetton TL, Latour MG, Peshavaria M, et al. Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia.* 2009 Jun;52(6):1122-32.

29. Jahanshahi P, Wu R, Carter JD, Nunemaker CS. Evidence of diminished glucose stimulation and endoplasmic reticulum function in nonoscillatory pancreatic islets. *Endocrinology*. 2009 Feb;150(2):607-15.
30. Krippeit-Drews P, Dufer M, Drews G. Parallel oscillations of intracellular calcium activity and mitochondrial membrane potential in mouse pancreatic B-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Jan 7;267(1):179-83.
31. Hussain K, Clayton PT, Krywawych S, Chatziandreou I, Mills P, Ginbey DW, et al. Hyperinsulinism of infancy associated with a novel splice site mutation in the SCHAD gene. *The Journal of pediatrics*. 2005 May;146(5):706-8.
32. Russell RR, 3rd, Taegtmeier H. Coenzyme A sequestration in rat hearts oxidizing ketone bodies. *J Clin Invest*. 1992 Mar;89(3):968-73.
33. Lai JC, Cooper AJ. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochemical research*. 1991 Jul;16(7):795-803.
34. Guerre-Millo M. Regulation of ob gene and overexpression in obesity. *Biomed Pharmacother*. 1997;51(8):318-23.
35. Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE. Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *J Biol Chem*. 1992 Mar 25;267(9):5802-10.
36. MacDonald MJ, Smith AD, 3rd, Hasan NM, Sabat G, Fahien LA. Feasibility of pathways for transfer of acyl groups from mitochondria to the cytosol to form short chain acyl-CoAs in the pancreatic beta cell. *J Biol Chem*. 2007 Oct 19;282(42):30596-606.
37. Macdonald MJ, Hasan NM, Longacre MJ. Studies with leucine, beta-hydroxybutyrate and ATP citrate lyase-deficient beta cells support the acetoacetate pathway of insulin secretion. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Jul-Aug;1780(7-8):966-72.
38. MacMullen C, Fang J, Hsu BY, Kelly A, de Lonlay-Debeney P, Saudubray JM, et al. Hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome in children with regulatory mutations in the inhibitory guanosine triphosphate-binding domain of glutamate dehydrogenase. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001 Apr;86(4):1782-7.

39. Filling C, Keller B, Hirschberg D, Marschall HU, Jornvall H, Bennett MJ, et al. Role of short-chain hydroxyacyl CoA dehydrogenases in SCHAD deficiency. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008 Mar 28;368(1):6-11.
40. Vredendaal PJ, van den Berg IE, Malingre HE, Stroobants AK, Olde Weghuis DE, Berger R. Human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: cloning and characterization of the coding sequence. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996 Jun 25;223(3):718-23.

Figure legends

Figure 1 RNAi-mediated knockdown of HADHSC increases insulin secretion. INS832/13 cells were transfected with scrambled control, shRNA or siRNA HADHSC, or mock control by electroporation and cells were cultured for 72h prior to the experiment. A) Representative immunoblot of HADHSC knockdown by shRNA and siRNA 72h post-transfection. B, C) Glucose- and KCl-induced insulin secretion. Insulin secretion was measured in shRNA (B) and siRNA (C) transfected cells incubated at 1, 5, or 11 mM glucose (G), or 1 mM glucose + 35 mM KCl, in absence or presence of 0.3 mM exogenous palmitate (FFA). D) Amino acid-induced insulin secretion. Insulin secretion was measured in transfected cells incubated at 1 mM glucose or 1 mM glucose + 5 mM L-leucine + 5 mM L-glutamine (Leu/Gln). E) Total insulin content of transfected cells. The insulin levels were normalized by protein content. Means \pm SEM of three (shRNA) to four (siRNA) experiments done each with quadruplicate cell wells. Two-tailed unpaired Student *t*-test analysis: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, *versus* scrambled control, under the same glucose concentration.

Figure 2 Cytosolic calcium is unchanged upon glucose and KCl stimulation in HADHSC deficient cells. Cytoplasmic free calcium was measured by confocal microscopy using the dye Fluo-4 AM. A) Sum of fluorescence intensities of 130 cells as a function of time for Scr Control- or siRNA HADHSC-transfected cells normalized by baseline fluorescence at 1 mM glucose upon treatment with 11 mM glucose (left) or 1 mM glucose + 35 mM KCl

(right). B) Area under the curve (AUC) of glucose- (for the interval 200 to 600 s) and KCl-treated (between 40 and 120 s) Scr Control- or siRNA HADHSC- transfected cells. Fluorescence level is expressed in arbitrary units. Data represent means \pm SEM of 3 independent experiments in which 130 randomly chosen cells were analysed in each experiment for each transfection condition.

Figure 3 Lack of effect of L-3-hydroxybutyrate and L-3-hydroxyglutarate on GSIS. Insulin release was measured in INS832/13 cells, incubated at 1, 5 or 11 mM glucose (G), or 1 mM glucose + 35 mM KCl, in absence or presence of 1 mM dimethyl-L-3-hydroxyglutarate (A), 1 mM methyl-L-3-hydroxybutyrate or 1 mM methyl-D-3-hydroxybutyrate (B). Means \pm SEM of three experiments done in quadruplicate.

Figure 4 HADHSC deficiency and the β -oxidation of fatty acids. Cells were cultured for 72h after transfection and then incubated at 1, 5 or 11 mM glucose (G) for 1h. A) Total fatty acid oxidation was measured using [1- 14 C]-palmitate. Results represent the sum of oxidation products released as $^{14}\text{CO}_2$ and acid soluble compounds. B) Oxidation of [1- 14 C]-octanoate was measured by determining released $^{14}\text{CO}_2$. Means \pm SEM of three experiments done in triplicate. Two-tailed unpaired Student *t*-test analysis: **p* < 0.05 *versus* scrambled control under the same glucose concentration.

Figure 5 Transaminase activity is required for the hyperinsulinemia induced by HADHSC knockdown. Insulin secretion was measured in cells incubated at 1, 5, or 11 mM glucose, or 1 mM glucose + 35 mM KCl, in presence or absence of 1 mM aminooxyacetate. Means \pm SEM of three experiments done in quadruplicate. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test analysis: ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

Figure 6 L-carnitine does not potentiate GSIS in HADHSC deficient cells. Insulin secretion was measured in cells incubated at 1, 5, or 11 mM glucose, or 1 mM glucose + 35 mM KCl, in presence or absence of 1 mM L-carnitine. Means \pm SEM of three experiments

done in quadruplicate. Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test analysis: *** $p < 0.001$.

Figure 7 HADHSC mRNA expression is lowered in hyperinsulinemic Zucker Fatty rat pancreatic islets. Plasma insulin from six- and nine-week old ZF and ZL rats was measured by radioimmunoassay. HADHSC expression was measured by Real-Time PCR in ZL and ZF rats. Expression was normalized with cyclophilin. Mean \pm SEM of three (ZL) or four (ZF) animals. Two-tailed unpaired Student *t*-test analysis: * $p < 0.05$ versus ZL.

Figure 8 Potential mechanism for HADHSC regulation of insulin secretion

HADHSC is expressed at high level in the β -cell^{23, 40} and a recent report suggested that HADHSC interacts with and could regulate GDH³⁹. Therefore, the absence of HADHSC may relieve this inhibition and contribute to increased insulin secretion by enhancing anaplerotic input into the Krebs cycle via the GDH reaction. HADHSC deficiency may also contribute to increased GDH activity in a more indirect way. Accumulating sc-FA-CoAs are known to inhibit KGDH and thus may lead to a reduction in GTP formation by succinyl-thiokinase, an allosteric inhibitor of GDH. We propose that upon stimulation with glucose or leucine plus glutamine, increased production of short-chain acyl-CoA molecules such as acetoacetyl-CoA could contribute to an increased mitochondrial level of α KG and its efflux from the mitochondria to transaminate with Asp to form Glu and OAA. The increased transamination increases cytosolic OAA that is transformed to malate and pyruvate via the actions of MDH and ME. The MDH step allows cytosolic NAD reoxydation for high glycolysis, whereas accelerated flux through ME increases NADPH production that acts as a metabolic coupling factor to promote insulin secretion. Accumulating sc-FA-CoA or sc-FA-Carn could also act as metabolic coupling factors to promote insulin secretion by a still undetermined mechanism. Ac-CoA, acetyl-CoA; α KG, α -ketoglutarate; Asp, aspartate; β -ox, β -oxidation; GDH, glutamate dehydrogenase; Gln, glutamine; Glu, glutamate; HADHSC, short-chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase; KGDH, α -ketoglutarate dehydrogenase; Leu, leucine; MDH, malate dehydrogenase; ME,

malic enzyme; OAA, oxaloacetate; sc-FA-carn, short-chain fatty-acyl-carnitine; sc-FA-CoA, short chain FA-CoA; Succ, succinate; Succ-CoA, succinyl-CoA; TA, transaminase; --> signifies regulation,> signifies putative reaction.

Figures

Figure 1

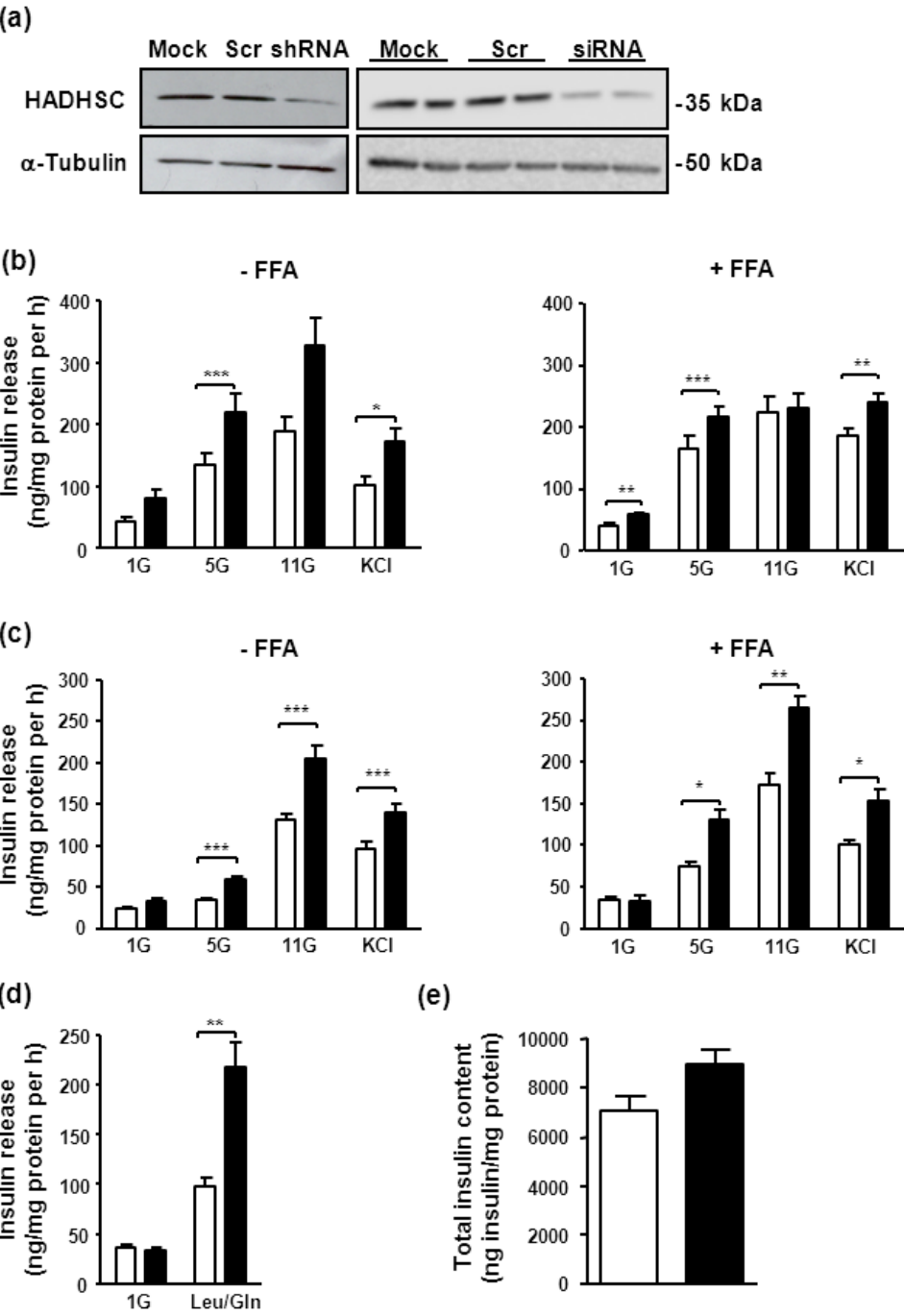
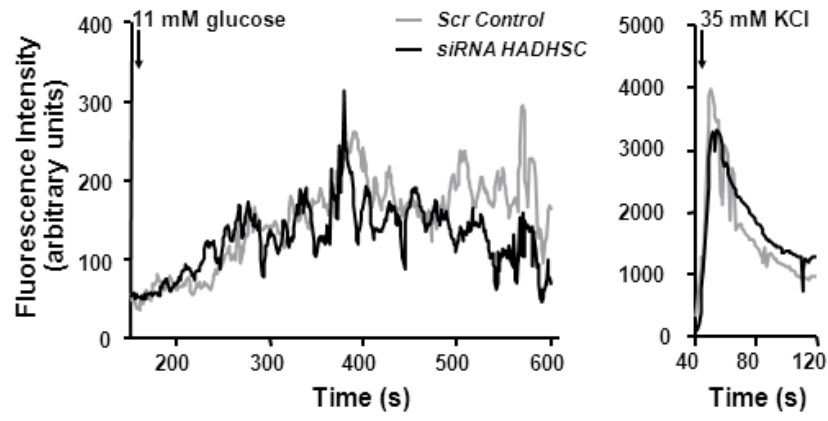


Figure 2

(a)



(b)

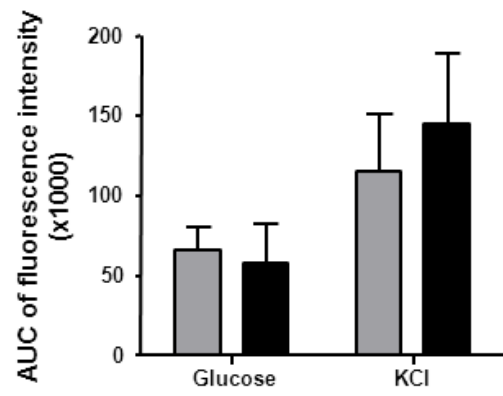


Figure 3

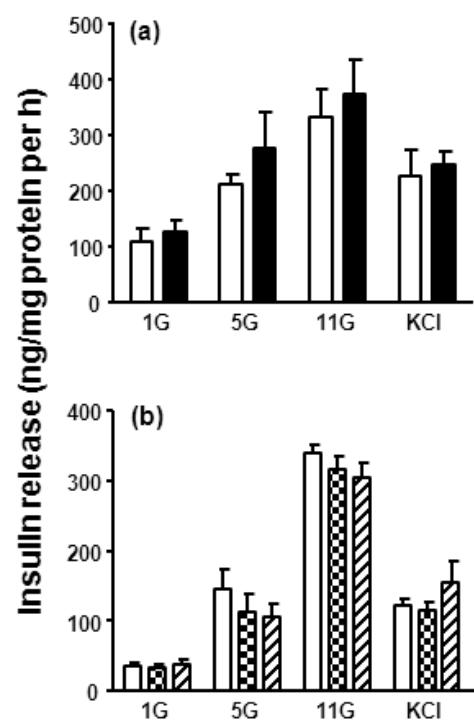


Figure 4

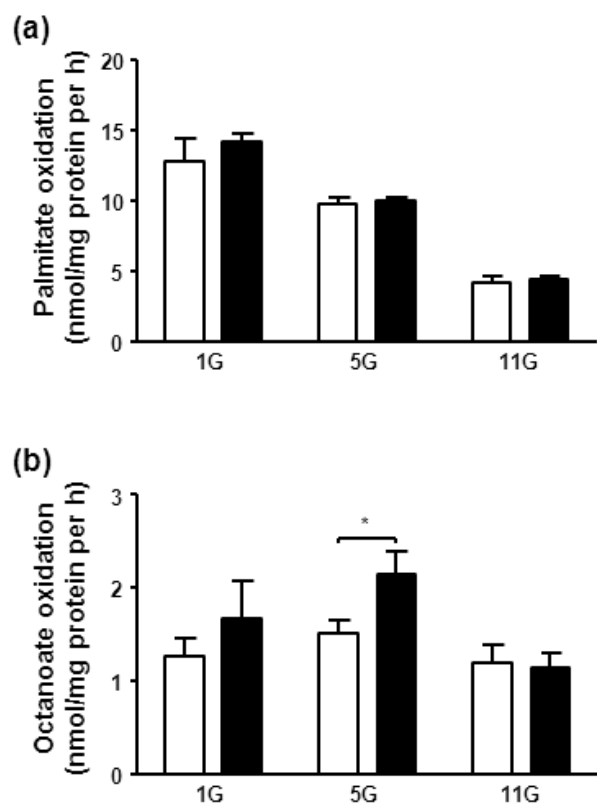


Figure 5

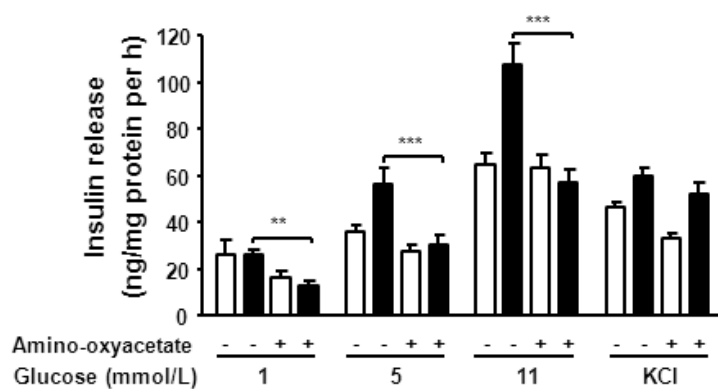


Figure 6

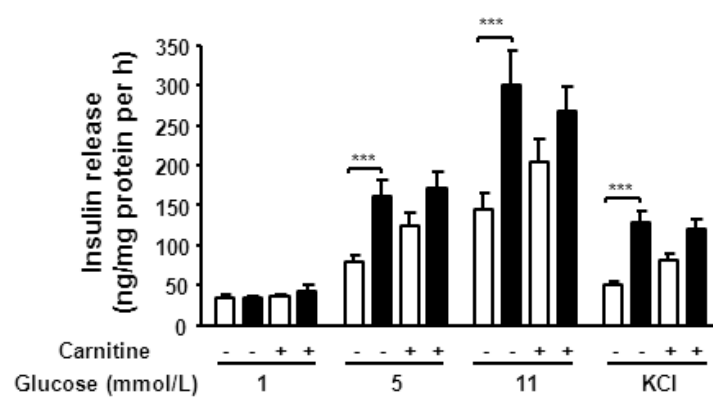
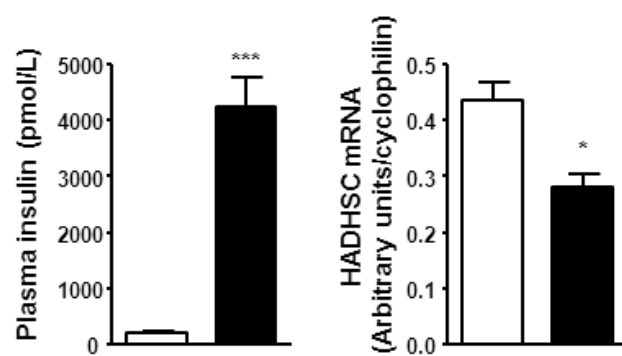


Figure 7



[illegible]

Mise en contexte de l'article 2

Les personnes obèses normoglycémiques sont généralement résistantes à l'insuline, mais la sécrétion d'insuline compensatoire par les cellules β permet le maintien d'une glycémie normale (Kahn *et al*, 2006; Henquin *et al*, 2008). Par contre, les cellules β des personnes obèse diabétiques ne sont plus aptes à compenser pleinement pour l'insulinorésistance et c'est une diminution de la SIIG, souvent accompagnée d'une diminution de la masse des cellules β , qui cause le développement du DT2. Les études chez l'humain et les rongeurs ont soulevé l'idée nouvelle que ce n'est pas exactement la masse des cellules β qui importe, mais bien la masse 'fonctionnelle' qui détermine leur capacité à compenser la résistance à l'insuline (Henquin *et al*, 2008). La dyslipidémie liée à l'obésité est responsable du développement de l'insulinorésistance chez ces patients, et s'est montrée aussi responsable de la dysfonction de la cellule β (Lowell *et Shulman*, 2005). En effet, alors que l'exposition pour une période courte des cellules β à des concentrations élevées d'acides gras potentialise la SIIG, celle-ci est fortement diminuée suite à une exposition de longue durée, voire chronique (Prentki *et al*, 2002; Leung *et al*, 2004). De plus, des études *in vitro* ont démontré qu'une exposition chronique à des concentrations élevées d'acides gras entraîne en présence de glucose élevé une perte de fonction et l'apoptose des cellules β (glucolipotoxicité), contribuant à la dysfonction et la perte de masse des cellules β (El-Assaad *et al*, 2003).

L'administration d'une diète riche en gras (*high fat diet*, HFD) à des rongeurs est un modèle d'obésité avec diabète lié à la diète qui permet d'étudier les étapes précédant le développement de l'hyperglycémie. Au commencement de cette étude, les mécanismes impliqués dans la compensation des cellules β ainsi que les causes responsables de la perte de compensation et la dysfonction des cellules étaient mal définies. Alors que l'étude des modèles génétiques de DT2 tels le rat ZDF ou la souris db/db avaient permis d'identifier certains facteurs importants dans la compensation de la cellule β , ces modèles sont de nature extrême et reflètent peu la réalité du développement du DT2 qui est graduel et moins

extrême chez l'homme (*Zhou et al*, 1996; *Nolan et al*, 2006). En revanche, dans le modèle d'obésité induit par la diète (DIO *diet-induced obesity*), les souris deviennent insulino-résistantes et développent une hyperglycémie graduelle. Ceci suggère que malgré une tentative de compensation, les cellules β ne peuvent augmenter suffisamment la sécrétion d'insuline, causant l'apparition d'une hyperglycémie légère.

Nous avons donc étudié dans ce modèle les mécanismes impliqués dans la diminution de sécrétion d'insuline de la cellule β . Pour ce faire, nous avons soumis des souris C57BL/6 à une diète riche en gras pour une durée de 8 semaines pour ensuite mesurer divers paramètres métaboliques importants pour la SIIG et le maintien d'une glycémie normale. L'originalité de notre étude réside particulièrement sur la stratification du phénotype (obésité) chez les animaux traités que nous avons adoptée lors de l'étude. En effet, nous avons observé une hétérogénéité marquée dans le gain de masse corporelle des souris nourries à la diète riche en gras. Ainsi, la ségrégation des souris DIO en deux groupes, les faibles (LDR, low diet responder) et les forts (HDR, high diet responder) répondants à la diète a permis l'étude de deux stades différents de développement de l'hyperglycémie.

Article 2

β -cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain : secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced β -cell mass

Marie-Line Peyot, Emilie Pepin, Julien Lamontagne, Martin G. Latour, Bader Zarrouki, Roxane Lussier, Marco Pineda, Thomas L. Jetton, S.R. Murthy Madiraju, Erik Joly, Marc Prentki

Montreal Diabetes Research Center (MDRC), the Centre de Recherche du CHUM, Molecular Biology program and Departments of nutrition and biochemistry, University of Montreal, Montreal, Canada. Department of diabetes and metabolism, University of Vermont College of Medicine, Burlington, Vt, USA.

Titre abrégé: β -cell dysfunction in diet-induced obese mice

Publication: Diabetes, 2010, 59, 2178-2187

Contribution des co-auteurs :

M-L. Peyot a effectué la majorité des expériences, l'analyse des résultats et l'écriture du manuscrit.

E. Pepin a participé à la réalisation des expériences et à la rédaction, l'édition et la révision du manuscrit.

J. Lamontagne a participé à l'isolement des îlots et a effectué les mesures de β -oxydation.

M.G. Latour a effectué les clamps hyperinsulinémique euglycémique et les IVGTT.

B. Zarrouki a effectué les expériences de périfusion.

R. Lussier a participé aux expériences.

M. Pineda a participé aux expériences.

T.L.Jetton a réalisé l'analyse de la masse des cellules β et de la prolifération.

S.R.M. Madiraju a participé à l'analyse des résultats.

E. Joly a participé à l'analyse des résultats.

M. Prentki a contribué à l'élaboration du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Beta Cell Failure in Diet-Induced Obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta cell mass

Marie-Line Peyot¹, Emilie Pepin¹, Julien Lamontagne¹, Martin G. Latour¹, Bader Zarrouki¹, Roxane Lussier¹, Marco Pineda¹, Thomas L. Jetton², S.R. Murthy Madiraju¹, Erik Joly¹ and Marc Prentki^{1,3}

Montreal Diabetes Research Center and CRCHUM, Montreal, QC¹; Diabetes and Metabolism, University of Vermont College of Medicine, Burlington, VT²; Departments of Nutrition and Biochemistry, University of Montreal, QC³.

Correspondence:

Marie-Line Peyot, PhD
CRCHUM, Technopôle Angus
2901 Rachel Est, Montréal, QC H1W 4A4, Canada
Tél: +1 (514) 890-8000 # 23655
Fax: +1 (514) 412-7648

Running title: β -cell dysfunction in diet-induced obese mice

Word count: 3992

Figures: 6

Tables: 2

Supplemental data: 1 table and 2 figures

ABSTRACT

OBJECTIVE-C57Bl/6 mice develop obesity and mild hyperglycemia when fed a high fat diet (HFD). Although diet-induced obesity (DIO) is a widely studied model of type 2 diabetes, little is known about β -cell failure in these mice.

RESEARCH DESIGNS AND METHODS- DIO mice were separated in two groups according to body weight gain: low- and high-HFD-responders (LDR and HDR). We examined whether mild hyperglycemia in HDR mice is due to reduced β -cell mass or function, and studied islet metabolism and signalling.

RESULTS- HDR mice were more obese, hyperinsulinemic, insulin resistant, hyperglycemic and showed a more altered plasma lipid profile than LDR. LDR mice largely compensated insulin resistance, whereas HDR showed perturbed glucose homeostasis. Neither LDR nor HDR mice showed reduced β -cell mass, altered islet glucose metabolism and triglyceride deposition. Insulin secretion in response to glucose, KCl and arginine was impaired in LDR and almost abolished in HDR islets. Palmitate partially restored glucose- and KCl-stimulated secretion. The glucose induced rise in ATP was reduced in both DIO groups, and the glucose-induced rise in Ca^{2+} was reduced in HDR islets relatively to LDR. Glucose-stimulated lipolysis was decreased in LDR and HDR islets, whereas fat oxidation was increased in HDR islets only. Fatty acid esterification processes were markedly diminished and free cholesterol accumulated in HDR islets.

CONCLUSIONS- β -cell failure in HDR mice is not due to reduced β -cell mass and glucose metabolism or steatosis but to a secretory dysfunction that is possibly due to altered ATP/ Ca^{2+} and lipid signalling, and free cholesterol deposition.

While insulin resistance is a common feature in most obese subjects, insulin secretion is increased to compensate for its reduced action and normoglycemia is maintained (1; 2). In obese type 2 diabetes (T2D) subjects, however, β -cell compensation fails due to marked impairment of glucose-stimulated insulin secretion (GSIS), often with reduced β -cell mass (2). The relationship between β -cell function and mass as causative factors in β -cell failure and diabetes progression is debated, with emphasis on the relevance of “functional β -cell mass” rather than total mass (2). Increased adiposity leads to elevated circulating free fatty acids (FFA) and triglycerides (TG), and *in vitro* and *in vivo* studies have indicated a causative role for dyslipidemia in insulin resistance (1; 3). Although FFA are necessary for the amplification of GSIS, their excess supply may also have a role in β -cell failure (4), as prolonged elevation of FFA levels both *in vivo* and *in vitro* cause β -cell dysfunction (5; 6) and, at least *in vitro*, apoptosis (7).

At least part of the β -cell compensation to insulin resistance is due to an increase in β -cell mass (4). Either long-term high fat diet (HFD) (8) or a short-term lipid infusion (9) can result in increased β -cell mass without augmentation of GSIS, indicating that β -cell function and mass are not necessarily linked. Rodent studies have indicated that HFD leads to increased β -cell mass (8), which is also observed in normoglycemic obese individuals (10). Unclear at present is the dynamics between the factors driving compensatory increase in β -cell mass and function, and those reducing them through the various stages of T2D development, particularly as FFA may do both. Genetic islet susceptibility may be a critical determinant of these dynamics, both in humans and animal models (4; 11; 12).

Even though studies employing genetically modified models (e.g. Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rats, *db/db* mice) have helped in understanding some of these pathological processes (13-16), several of these models are of extreme nature, with rapid development of pronounced T2D. These models, therefore, differ from human obesity-linked T2D, which usually develops more gradually. In an attempt to gain insight into the basis of β -cell failure in a mild model of diabetes, we recently developed a new model of T2D, the 60% pancreatectomized obese hyperlipidemic Zucker Fatty (ZF) rat (14). In this model, severe β -cell dysfunction was found without any evidence of a falling β -cell mass or islet steatosis

(14). More detailed examination of the pancreatectomized ZF rat islets showed marked depletion of insulin stores and altered glycerolipid metabolism (14). The ZF rat, as opposed to the ZDF, however, does not have genetic predisposition to diabetes, as it maintains normoglycemia despite severe obesity-related insulin resistance (4). The diet-induced obese (DIO) C57BL/6 mouse gradually develops hyperglycemia (17). This suggests that DIO islets are unable to fully compensate for the obesity-related insulin resistance, as occurs in human T2D.

In the present study we investigated β -cell dysfunction in DIO mice stratified into two groups according to the effect of HFD on body weight: the low responders to HFD (LDR) were less obese, developed intermediate severity insulin resistance and had only mild impairment in glycemia. The high responders to HFD (HDR) were more obese, insulin resistant and hyperinsulinemic and were clearly hyperglycemic. Thus, the LDR and HDR groups allowed for analysis and comparison of islet β -cell mass and function in response to different levels of insulin resistance with corresponding very mild perturbation of glucose homeostasis and overt but mild hyperglycemia, respectively. When extended to obese humans, these two groups correspond to the pre-diabetes and early diabetes situations.

RESEARCH DESIGN AND METHODS

Animals and diets. Five-week-old male C57BL/6 mice on a pure genetic background were purchased from Charles River Laboratories (St-Constant, QC, Canada). We verified by RT-PCR analysis that this mouse strain does not harbour a mutation in the nicotinamide nucleotide transhydrogenase gene found in the C57BL/6J strain (18) (data not shown). They were housed 3-4 per cage on a 12-h light/dark cycle at 21°C with free access to water and standard diet (Teklad Global 18% protein rodent diet; Harlan Teklad, Madison, WI, 15% fat by energy). One week after arrival, mice were fed with either the standard or HFD (Bio-Ser Diet#F3282, Frenchtown, NJ, 60% fat by energy) for 8 weeks. Body weight and energy intake were measured weekly. For the energy intake measurement, the mice were placed in individual cages. Fed blood glucose was determined by a portable glucometer (Accu-check Advantage, Roche, Indianapolis, IN). All procedures were approved by the

Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Plasma parameters. Blood was collected between 8:00 and 10:00 A.M. in fed mice. Plasma insulin and proinsulin were measured by radioimmunoassay (Linco Research, St. Charles, MO) and by ELISA (proinsulin mouse kit, Alpco Diagnostics, Salem, NH), respectively. Plasma non-esterified fatty acids (NEFA) were assessed using the NEFA C kit (Wako Chemical, Osaka, Japan). Plasma TG was determined with the GPO Trinder kit (Sigma Aldrich, Saint Louis, MS) and cholesterol with the Amplex red assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR).

Glucose homeostasis, insulin action and secretion *in vivo*. Two-hour hyperinsulinemic euglycemic clamp (HIEC) studies were performed in 2h-fasted anesthetised ND, LDR and HDR mice after 8 weeks on the experimental diets (19). An intravenous glucose tolerance test (IVGTT) (0.5 g/kg) was conducted in 16h-overnight fasted mice (20). An oral glucose tolerance test (OGTT) (1g/kg) was also made in 6h-fasted mice (20). Blood glucose was measured using a portable meter and plasma insulin using the UltraSensitive mouse Insulin ELISA Kit (Alpco Diagnostics).

β -cell proliferation and mass. These parameters were measured as described (21).

Islet isolation and culture. Islets were isolated as described (22) and kept in culture at 3 mmol/L glucose for 2h in RPMI medium supplemented with 10% FBS (complete RPMI) at 37°C, for recovery (23).

Insulin secretion *ex vivo*. For static incubations, batches of 10 islets each, were distributed in 12-well plates and pre-incubated for 45 min at 37°C in Krebs-Ringer bicarbonate containing 10 mmol/L HEPES (pH 7.4) (KRBH), 0.5% defatted BSA (d-BSA) and 3 mmol/L glucose. They were then incubated for 1h in KRBH/0.5% d-BSA at 3, 8 and 16 mmol/L glucose or with 35 mmol/L KCl, in the presence or absence of 0.25 mmol/L palmitate. After 1h, media were kept for insulin measurements by radioimmunoassay. Islet insulin and proinsulin contents were measured following acid-ethanol (0.2 mmol/L HCl in 75% ethanol) extraction by radioimmunoassay and ELISA, respectively. For perfusion experiments, batches of 120 cultured islets each were placed in perfusion chambers at

37°C and perfused at a flow rate of 1ml/min for 30 min in KRBH/0.5% d-BSA at 3 mmol/L glucose prior to stimulation with 16 mmol/L glucose for 60 min, and then with 10 mmol/L arginine for 10 min. Islets were then perfused at 3 mmol/L glucose for 30 min.

Intracellular calcium. Ca^{2+} was measured using a modified version of a procedure previously described (24). Dispersed-islet cells from 350-500 freshly isolated islets were plated on 42 mm coverslip and incubated at 37°C overnight in complete RPMI at 11 mmol/L glucose. Cells loaded with Fluo-4 AM calcium indicator were perfused with KRBH/1% d-BSA, 2.5 mmol/L probenidol, 0.2 mmol/L sulfinpyrazone, 0.1 mmol/L IBMX and 3 or 16 mmol/L glucose or 3 mmol/L glucose + 35 mmol/L KCl. Computational analysis was done using measurements every 3 s. An average of 25 cells per coverslip was analyzed.

Intracellular ATP content. Batches of 50 islets cultured and pre-incubated as described for insulin secretion experiments were incubated for 15 min in KRBH/0.07% d-BSA at 3 or 16 mmol/L glucose. At the end of the incubation, ATP was extracted from islets and assay as described (22).

Islet triglyceride, cholesterol and protein contents. TG, cholesterol and protein contents were measured in batches of 100, 40 and 20 freshly isolated islets, respectively (23; 25).

Lipid metabolism. For lipolysis, 60 islets per determination were used (23). Fatty acid (FA) oxidation and esterification into cholesterol ester were measured in batches of 50 islets (14). NEFA content and FA esterification into TG in 50 islets were determined as described (26).

Glucose metabolism. Islet glucose usage and oxidation were measured as described (22).

Quantitative RT-PCR. see supplemental research design and methods in the online appendix.

Statistical analysis. Data are expressed as means \pm SE. Statistical significance was calculated by one-way or two-way ANOVA with Bonferroni, Tukey or Dunnett post hoc testing as indicated. A *P* value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Metabolic characteristics of LDR and HDR mice. For mechanistic analyses, pooling mice with markedly different characteristics (for example little weight gain, no insulin resistance and normoglycemia with animals with high weight gain, insulin resistance and hyperglycemia), as has been done in the vast majority of studies so far, can be misleading. We reasoned that this caveat can be dealt by stratifying mice in two groups (LDR and HDR) (as described below) that correspond on one hand to lower weight gain and mild perturbation in glucose homeostasis, and on the other hand to higher weight gain and overt but mild hyperglycemia. Based on the heterogeneous weight response to diet (approximately 12 g range for DIO mice housed by group of 3-4/cage or individually) (Fig. 1A), DIO mice were segregated into two groups after 7.5 weeks on HFD: LDR mice, representing 40% of the DIO mice and weighing 33-38.9 g (lower 6 g range) with an average fed glycemia of 8.6 ± 0.1 mmol/L, and HDR mice, representing 52% of the DIO mice and weighing 39-45 g (higher 6 g range) with an average glycemia of 9.4 ± 0.1 mmol/L (Fig. 1B). DIO outlier mice weighing less than 33g (around 4% of total DIO mice) and more than 45g (around 4%) were excluded from this study (Fig. 1A). The control group fed with the standard diet (normal diet, ND) had an average weight of 28.3 ± 0.2 g and a glycemia of 7.5 ± 0.1 mmol/L (Fig. 1B). Difference in body weight in DIO mice was already present after 1 week under HFD and steadily increased during the 8 weeks of the study (Fig. 1C). The considerably larger weight of HDR mice can be accounted at least in part to an increased energy intake (106.8 ± 1.4 vs. 98.3 ± 1.4 Kcal/week in LDR mice, Fig. 1D, inset). Table 1 shows that over 8 weeks HFD-fed LDR and HDR mice, respectively, gained approximately 2-3 and 3-4 times more weight compared to ND mice. LDR mice had a very slightly raised glycemia in the fed state (Fig. 1B). The 2h-fasting blood glucose of LDR mice was not significantly increased (Fig. 2A). In contrast the HDR group showed a more prominent hyperglycemia than LDR mice. Blood glucose in HDR mice was increased in awake fed mice (9.4 ± 0.1 vs. 7.5 ± 0.1 mmol/L in ND mice, Fig. 1B) and in 2h-fasted anaesthetized mice (11.0 ± 0.9 vs. 5.7 ± 0.5 mmol/L in ND mice, Fig. 2A). Glucose levels in

6h-fasted HDR mice *versus* ND mice (11.6 ± 0.5 vs. 7.4 ± 0.3 mmol/L) was elevated, and the LDR group showed intermediate values (9.8 ± 0.4 mmol/L) (Suppl. Fig. 1A and C). Glycemia in overnight 16h-fasted HDR mice with anaesthesia was slightly elevated, without reaching statistical significance (8.3 ± 0.3 vs. 7.0 ± 0.4 mmol/L, Fig. 2E). Glucose values at time 60 min during an IVGTT (Fig. 2E) and time 120 min during an OGTT (Suppl. Fig. 1A and D) remained markedly elevated in HDR, in contrast to the LDR mice. Fasting and fed insulinemia were 3-4 fold higher in the HDR compared to ND mice, whereas in LDR mice fed insulinemia was unchanged and fasting insulinemia was increased by twofold (not statistically significant) (Table. 1). Fed proinsulinemia was higher in HDR mice in comparison to ND, and the proinsulin to insulin ratio was unchanged in LDR and HDR mice *versus* controls. Of the measured lipid parameters, when compared to ND mice, fed plasma cholesterol was significantly increased by 70% in HDR mice, fasting plasma FFA were 2-fold higher in HDR mice and fed plasma TG was 30% decreased in both DIO groups (Table. 1).

LDR and HDR mice are insulin-resistant, glucose-intolerant and have a decreased first phase insulin secretion in response to glucose *in vivo*. A hyperinsulinemic-euglycemic clamp was made in 2h-fasted ND and DIO mice (Fig. 2A-D). Both the glucose infusion rate (Fig. 2C) required to maintain glycemia at ~ 7.2 mmol/L (Fig. 2B) and the insulin sensitivity (M/I) index (Fig. 2D) were decreased by $\sim 50\%$ and $\sim 80\%$ in LDR and HDR mice, respectively, indicating that HDR mice are more insulin resistant than LDR. To measure GSIS *in vivo*, overnight-fasted DIO and ND mice were subjected to an IVGTT (Fig. 2E-I). Glucose clearance was reduced in HDR mice (Fig. 2E), indicating a decreased glucose tolerance as shown by a 2-fold increase in the area under the curve (AUC) for glycemia (Fig. 2G). LDR mice tended to be glucose intolerant but without reaching statistical significance (Fig. 2E and G). Similar observation was made using the OGTT test (Suppl. Fig. 1A and B). Calculation of the AUC for insulinemia during the first 15 min of the IVGTT, subtracting basal values, indicated that first phase GSIS is reduced by 66 and 76% in the LDR and HDR groups, respectively (Fig. 2F and H). However, the AUC for the second phase GSIS of both DIO mice was not different from control mice (Fig. 2F and I).

Impaired insulin secretion in isolated islets from LDR and HDR mice. We next examined GSIS in presence or absence of exogenous FFA in isolated islets. In ND mice, glucose from 3 to 16 mmol/L increased insulin secretion by 2.6 fold (Fig. 3A). The glucose effect in both DIO groups was reduced, and was almost completely blunted in HDR mice (Fig. 3A and D). LDR and HDR mice also showed defective KCl-induced insulin secretion (KSIS), the reduction being more pronounced in the HDR group (Fig. 3C). Exogenous palmitate enhanced GSIS in the 3 groups (Fig. 3B) and partially restored GSIS, as evaluated by the difference between high and low glucose values (Fig. 3D), as well as KSIS (Fig. 3C), in both DIO groups. First phase GSIS was reduced by 47 and 65% in LDR and HDR perfused islets, respectively (Fig. 3E-F). HDR mice also showed a 5-fold decrease in second phase GSIS (Fig. 3G) and in secretion in response to arginine (Fig. 3H).

Lack of decreased pancreatic β -cell mass and islet insulin stores in DIO islets. HDR mice showed a 1.7- and 2-fold increase in β -cell mass (Fig. 4A) and proliferation (Fig. 4B), respectively. There was a trend for β -cell mass and proliferation to be increased in the LDR group. Islet protein contents were increased by 24 and 44% in LDR and HDR mice, respectively (Fig. 4C). Total insulin content per islet was similar in all groups (Fig. 4D), however islet content corrected per protein content decreased by 20 and 24% in LDR and HDR islets, respectively (Fig. 4E). The islet proinsulin content per protein was similar in all groups (Fig. 4F).

Islet glucose metabolism is unchanged in DIO mice. Previous work in T2D rodent models has suggested a role for altered glucose metabolism in β -cell dysfunction (27; 28). Fig. 4 indicates that impaired GSIS in LDR and HDR mice cannot be ascribed to altered glucose metabolism, since glucose usage (Fig. 4G) and oxidation (Fig. 4H) were unchanged.

Decreased glucose-stimulated ATP content in DIO islets and altered Ca^{2+} signaling in HDR islet cells *versus* LDR. ND mice showed a 40 % increase in intracellular ATP content in response to high glucose, whereas both DIO groups displayed a reduced response (Fig. 4I). The rise in Ca^{2+} in response to glucose was markedly larger in LDR *versus* ND

islet cells (Fig. 4J). However, the HDR group did not show such potentiation that likely reflects a compensation phenomenon.

Altered lipid partitioning, reduced glycerolipid/fatty acid cycling and free cholesterol deposition in HDR islets. Islet steatosis was proposed to contribute to β -cell failure (29). However, there was no accumulation of TG in DIO islets (Fig. 5A). Work from our (13; 14; 22; 23) and other groups (30-32) documented a role of β -cell lipolysis and GL/FFA cycling in insulin secretion. Lipolysis, evaluated by glycerol release, was increased 2-fold by elevated glucose in ND islets (Fig. 5B), and this increase was abolished in DIO islets. Fatty acid partitioning (FA oxidation and esterification) was studied in DIO islets since it provides lipid signals for secretion (33). FA oxidation was similar in both ND and LDR islets (Fig. 5C). However, FA oxidation was increased by 60% in HDR islets. HDR islets had a 70% higher level of NEFA (an index of long-chain acyl-CoA content) at 3 mmol/l glucose (Fig. 5D) consistent with the elevated FA oxidation at low glucose (Fig. 5C). At 16 mmol/l glucose, intracellular NEFA remained not significantly different in all groups (Fig. 5D). Glucose-stimulated palmitate esterification into TG was reduced by about 25% in LDR and HDR islets (Fig. 5E). An altered lipid esterification process in DIO islets was also evident from the observed reduction in palmitate esterification into cholesterol esters in islets from both DIO groups (Fig. 5F). This was associated with a 90% and 60% increase in free cholesterol in HDR *versus* ND and LDR islets, respectively (Fig. 5G).

Expression of key transcriptional factors, exocytosis proteins and enzymes of glucose and lipid metabolism. A panel of mRNA levels was measured to gain insight into the basis of β -cell (de)compensation. Only the mRNA levels of insulin-2, UCP-2 (uncoupling protein-2), SCD-1 (stearoyl-CoA desaturase-1), ACC-2 (acetyl-CoA carboxylase-2) and ATGL (adipose triglyceride lipase) significantly changed in DIO islets (Suppl. Fig. 2A-D). Insulin-2 mRNA was increased in both DIO groups, reaching significance only in HDR islets (Suppl. Fig. 2B). Increased expression of UCP-2 in the β -cell is thought to play a role in reducing reactive oxygen species production but the role of UCP2 in mitochondrial uncoupling or changes in GSIS is debated (34; 35). UCP-2 mRNA level was increased by about 40% in both LDR and HDR islets (Suppl. Fig. 2C). A 56% increase in ATGL

expression, an enzyme involved in triglyceride hydrolysis, was detected in HDR islets (Suppl. Fig. 2C), that may reflect a compensation phenomenon. In accordance with the increased FFA oxidation in HDR islets (Fig. 5C) and the decreased FA esterification in TG in DIO islets (Fig. 5E), ACC-2 mRNA was decreased by 45% in HDR islets and SCD-1 mRNA was reduced in DIO islets (Suppl. Fig. 2D). Thus, SCD-1 is involved in the desaturation of FFA and is important for FA esterification (36) whereas ACC-2 negatively regulates FFA oxidation via the production of malonyl-CoA (37).

DISCUSSION

According to body weight response to HFD, we stratified C57Bl/6 DIO mice in two groups. HDR mice are markedly obese, hyperinsulinemic, insulin resistant, glucose intolerant, and show an altered plasma lipid profile in association with overt but mild hyperglycemia (Table. 2). LDR mice have an “intermediate” phenotype and show relatively successful compensation since they are barely glucose intolerant and only very slightly hyperglycaemic. Thus, defining these two groups allows the study of the basis of β -cell compensation and failure in two groups of obese mice with the same genetic background and under identical experimental conditions. The HDR group and its comparison with LDR and ND mice also allows insight into the causal factors of β -cell failure to sustain the increase demand of insulin in the face of elevated insulin resistance. Importantly, study of HDR and LDR mice may distinguish the alteration in the β -cell that are related to coping with the HFD load and obesity situation from those that may cause β -cell maladaptation to the rising insulin resistance with resulting dysfunction and mild hyperglycemia (the equivalent of prediabetes and early diabetes phases in humans).

What is the basis of the β -cell failure to insufficiently compensate for the higher insulin resistance in HDR mice? The results allow the exclusion of several factors (Table. 2): decreased β -cell glucose metabolism, islet steatosis, reduced β -cell mass and proliferation, and depletion of insulin stores since the latter was not significantly decreased per islet and reduced by only 30% if expressed per islet protein in a context where pancreatic β -cell

mass increased twofold. However it cannot be discounted that failure to promote even greater than twofold compensatory increase in β -cell mass, in part contributed to β -cell failure in the HDR group. Significant β -cell "dedifferentiation" is also unlikely to be involved in β -cell failure of HDR mice since they were markedly hyperinsulinemic, the islet mRNA expression of a large number of genes related to the phenotype of a well differentiated β -cell (PDX-1, MAF-A, Nkx6.1, Glut2, GK, PC, preproinsulin, Suppl. Fig. 2A) was unchanged, and islet glucose oxidation and utilization remained unaltered.

The results point to a role of alterations in the classical ATP/ Ca^{2+} signalling and lipid amplification pathways as well as free cholesterol deposition, in the failure of the HDR β -cells to compensate for the marked insulin resistance (Fig. 6). Thus, LDR islets displayed an amplified Ca^{2+} response to glucose that was not apparent in the HDR group, together with reduced rise in ATP content at high glucose, the latter, however, being also reduced in LDR islets. The reason for the enhanced Ca^{2+} response in the LDR group that should favour compensating insulin secretion remains to be determined. Furthermore, LDR and HDR mice showed altered lipid metabolism and signalling that may explain reduced glucose-, KCl- and arginine-induced insulin secretion. Thus, exogenous palmitate partially restored GSIS and KSIS in islets of both DIO groups. Importantly, the differences that were found between the compensating prediabetic LDR and decompensating (here defined as insufficient compensation) HDR groups were: enhanced fat oxidation and elevated intracellular NEFA at basal glucose in HDR islets, in association with an increased free cholesterol content, as well as a more pronounced reduction of FA esterification into cholesterol esters and SCD-1 expression (Table. 2). Our previous work indicated that both the balance of fat oxidation *versus* esterification, β -cell lipolysis and GL/FFA cycling play a role in GSIS (13; 14). As shown in Fig. 6, in HDR mice, impaired glucose-stimulated lipolysis and FA esterification should reduce the production of lipid signalling molecules such as diacylglycerol (33), that has been linked to the activation of C-kinase enzymes (38) and the exocytotic protein Munc13-1 (39), whereas enhanced fat oxidation should simultaneously cause their removal. Increased FA oxidation should also reduce FA-CoA

availability for cholesterol ester formation (a protective mechanism against the toxic effects of excess cholesterol) (40) leading to free cholesterol accumulation.

Alteration in β -cell cholesterol metabolism has emerged as a factor contributing to β -cell dysfunction as evidenced in a number of *in vitro* and *in vivo* studies (25; 41; 42). Interestingly, total plasma cholesterol and islet free cholesterol deposition occurred only in the HDR group, illustrating the interest of stratification of DIO groups. Cholesterol is abundant in lipid rafts that are implicated in exocytosis (43) and it can be hypothesized that such modification may contribute to the observed reduction in insulin secretion in response to all classes of secretagogues. Consistent with this view, Collins et al (44) observed reduced β -cell exocytosis elicited by short depolarization in DIO mice.

Comparison of *in vitro* and *in vivo* insulin secretion of DIO mice indicated that the secretory defect is more prominent *in vitro*. The nature of the factors allowing compensatory increased (but not sufficient) insulin secretion with hyperinsulinemia *in vivo* remains to be known and may include FFA as suggested by our *in vitro* work, enhanced incretin signalling, reduced levels of counter-regulatory hormones and neural pathways (45).

In conclusion, HDR mice fail to fully compensate for the prominent insulin resistance that exacerbates the demand for insulin to maintain euglycemia. HDR islets have a defect in β -cell secretory function in response to glucose and non-fuel stimuli that is possibly caused by: 1) a lack of compensatory increase in $\text{ATP}/\text{Ca}^{2+}$ signalling; 2) free cholesterol accumulation; 3) impaired lipid signalling due to a metabolic shift with altered lipid partitioning and GL/FFA cycling. We propose that all three factors contribute to the inappropriate capacity to maintain sufficient secretion in the face of insulin resistance. Additional work is required to define in further details the biochemical basis of β -cell failure in HDR DIO mice.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M-L.P. researched data, contributed to discussion, wrote manuscript, reviewed/edited manuscript. E.P. researched data, reviewed/edited manuscript. J.L. researched data. M.G.L. researched data, contributed to discussion. B.Z. researched data. R.L. researched data. M.P. researched data. T.L.J. researched data. S.R.M.M. contributed to discussion. E.J. contributed to discussion. M.P. contributed to discussion, wrote manuscript, reviewed/edited manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Canadian Diabetes Association, the Canadian Institute of Health Research and Génome Québec/Canada, (to MP and MM) and the US National Institutes of Health (to TLJ). MP is the recipient of a Canadian Chair in Diabetes and Metabolism. JL is supported by graduate studentships from the Fonds de Recherche en Santé du Québec and EP was supported by a graduate studentship from association du Diabète du Québec. BZ is supported by a post-doctoral fellowship from Merck Frosst. We thank Drs Christopher. J Nolan (ANU Medical School, The Canberra Hospital, Australia), Barbara Corkey (Obesity Research Center, Department of Medicine, Boston University School of Medicine, USA) and Vincent Poitout (Montréal Diabetes Research Center, CRCHUM and Departments of Medicine, Nutrition and Biochemistry, University of Montréal, Canada) for critical review of the manuscript.

REFERENCES

1. Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM: Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 444:840-846, 2006
2. Henquin JC, Cerasi E, Efendic S, Steiner DF, Boitard C: Pancreatic beta-cell mass or beta-cell function? That is the question! *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:1-4, 2008
3. Lowell BB, Shulman GI: Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science* 307:384-387, 2005
4. Prentki M, Nolan CJ: Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *J Clin Invest* 116:1802-1812, 2006
5. Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, Spinas GA, Donath MY: Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function. *Diabetes* 52:726-733, 2003
6. Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, Giacca A: Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes* 48:524-530, 1999
7. El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaiibo G, Rosenberg L, Prentki M: Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology* 144:4154-4163, 2003
8. Hull RL, Kodama K, Utzschneider KM, Carr DB, Prigeon RL, Kahn SE: Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48:1350-1358, 2005
9. Steil GM, Trivedi N, Jonas JC, Hasenkamp WM, Sharma A, Bonner-Weir S, Weir GC: Adaptation of beta-cell mass to substrate oversupply: enhanced function with normal gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 280:E788-796, 2001
10. Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC: Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes* 52:102-110, 2003

11. Roder ME, Porte D, Jr., Schwartz RS, Kahn SE: Disproportionately elevated proinsulin levels reflect the degree of impaired B cell secretory capacity in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 83:604-608, 1998
12. Rahier J, Guiot Y, Goebbels RM, Sempoux C, Henquin JC: Pancreatic beta-cell mass in European subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab* 10 Suppl 4:32-42, 2008
13. Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, Fortier M, Guay C, Lamontagne J, Barbeau A, Przybytkowski E, Joly E, Masiello P, Wang S, Mitchell GA, Prentki M: Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia* 49:2120-2130, 2006
14. Delghingaro-Augusto V, Nolan CJ, Gupta D, Jetton TL, Latour MG, Peshavaria M, Madiraju SR, Joly E, Peyot ML, Prentki M, Leahy J: Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia* 52:1122-1132, 2009
15. Zhou YP, Cockburn BN, Pugh W, Polonsky KS: Basal insulin hypersecretion in insulin-resistant Zucker diabetic and Zucker fatty rats: role of enhanced fuel metabolism. *Metabolism* 48:857-864, 1999
16. Zhou YP, Berggren PO, Grill V: A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta-cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. *Diabetes* 45:580-586, 1996
17. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN: Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 37:1163-1167, 1988
18. Wong N, Blair AR, Morahan G, Andrikopoulos S: The deletion variant of nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) does not affect insulin secretion or glucose tolerance. *Endocrinology* 151:96-102, 2010
19. Alquier T, Peyot ML, Latour MG, Kebede M, Sorensen CM, Gesta S, Ronald Kahn C, Smith RD, Jetton TL, Metz TO, Prentki M, Poitout V: Deletion of GPR40 impairs glucose-induced insulin secretion in vivo in mice without affecting intracellular fuel metabolism in islets. *Diabetes* 58:2607-2615, 2009

20. Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V: GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes* 56:1087-1094, 2007
21. Jetton TL, Lausier J, LaRock K, Trotman WE, Larmie B, Habibovic A, Peshavaria M, Leahy JL: Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes* 54:2294-2304, 2005
22. Peyot ML, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, Ruderman NB, Haemmerle G, Zechner R, Joly E, Madiraju SR, Poitout V, Prentki M: Adipose Triglyceride Lipase Is Implicated in Fuel- and Non-fuel-stimulated Insulin Secretion. *J Biol Chem* 284:16848-16859, 2009
23. Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M: Hormone-sensitive lipase has a role in lipid signaling for insulin secretion but is nonessential for the incretin action of glucagon-like peptide 1. *Diabetes* 53:1733-1742, 2004
24. Pepin E, Guay C, Delghingaro-Augusto V, Joly E, Madiraju SR, Prentki M: Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a negative regulator of insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli in INS832/13 β -cells. *Journal of Diabetes* Accepted Article Online: Apr 23, 2010
25. Hao M, Head WS, Gunawardana SC, Hasty AH, Piston DW: Direct effect of cholesterol on insulin secretion: a novel mechanism for pancreatic beta-cell dysfunction. *Diabetes* 56:2328-2338, 2007
26. Peyot ML, Gray JP, Lamontagne J, Smith PJ, Holz GG, Madiraju SR, Prentki M, Heart E: Glucagon-like peptide-1 induced signaling and insulin secretion do not drive fuel and energy metabolism in primary rodent pancreatic beta-cells. *PLoS One* 4:e6221, 2009
27. Ohneda M, Johnson JH, Lee YH, Nagasawa Y, Unger RH: Post-GLUT-2 defects in beta-cells of non-insulin-dependent diabetic obese rats. *Am J Physiol* 267:E968-974, 1994
28. Fex M, Nitert MD, Wierup N, Sundler F, Ling C, Mulder H: Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia* 50:74-83, 2007

29. Lee Y, Hirose H, Ohneda M, Johnson JH, McGarry JD, Unger RH: Beta-cell lipotoxicity in the pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus of obese rats: impairment in adipocyte-beta-cell relationships. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:10878-10882, 1994
30. Fex M, Haemmerle G, Wierup N, Dekker-Nitert M, Rehn M, Ristow M, Zechner R, Sundler F, Holm C, Eliasson L, Mulder H: A beta cell-specific knockout of hormone-sensitive lipase in mice results in hyperglycaemia and disruption of exocytosis. *Diabetologia* 52:271-280, 2009
31. Mulder H, Yang S, Winzell MS, Holm C, Ahren B: Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes* 53:122-128, 2004
32. Cantley J, Burchfield JG, Pearson GL, Schmitz-Peiffer C, Leitges M, Biden TJ: Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse beta-cells. *Diabetes* 58:1826-1834, 2009
33. Nolan CJ, Madiraju MS, Delghingaro-Augusto V, Peyot ML, Prentki M: Fatty acid signaling in the beta-cell and insulin secretion. *Diabetes* 55 Suppl 2:S16-23, 2006
34. Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Becard D, Gjinojci A, Keller PA, Wollheim CB, Herrera P, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F: Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia* 50:84-93, 2007
35. Chan CB, De Leo D, Joseph JW, McQuaid TS, Ha XF, Xu F, Tsushima RG, Pennefather PS, Salapatek AM, Wheeler MB: Increased uncoupling protein-2 levels in beta-cells are associated with impaired glucose-stimulated insulin secretion: mechanism of action. *Diabetes* 50:1302-1310, 2001
36. Prentki M, Madiraju SR: Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev* 29:647-676, 2008
37. Abu-Elheiga L, Matzuk MM, Abo-Hashema KA, Wakil SJ: Continuous fatty acid oxidation and reduced fat storage in mice lacking acetyl-CoA carboxylase 2. *Science* 291:2613-2616, 2001

38. Biden TJ, Schmitz-Peiffer C, Burchfield JG, Gurisik E, Cantley J, Mitchell CJ, Carpenter L: The diverse roles of protein kinase C in pancreatic beta-cell function. *Biochem Soc Trans* 36:916-919, 2008
39. Kwan EP, Xie L, Sheu L, Nolan CJ, Prentki M, Betz A, Brose N, Gaisano HY: Munc13-1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. *Diabetes* 55:1421-1429, 2006
40. Busch AK, Gurisik E, Cordery DV, Sudlow M, Denyer GS, Laybutt DR, Hughes WE, Biden TJ: Increased fatty acid desaturation and enhanced expression of stearoyl coenzyme A desaturase protects pancreatic beta-cells from lipopoptosis. *Diabetes* 54:2917-2924, 2005
41. Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR: Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nat Med* 13:340-347, 2007
42. Hao M, Bogan JS: Cholesterol regulates glucose-stimulated insulin secretion through phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *J Biol Chem* 284:29489-29498, 2009
43. Xia F, Gao X, Kwan E, Lam PP, Chan L, Sy K, Sheu L, Wheeler MB, Gaisano HY, Tsushima RG: Disruption of pancreatic beta-cell lipid rafts modifies Kv2.1 channel gating and insulin exocytosis. *J Biol Chem* 279:24685-24691, 2004
44. Collins SC, Hoppa MB, Walker JN, Amisten S, Abdulkhader F, Bengtsson M, Fearnside J, Ramracheya R, Toye AA, Zhang Q, Clark A, Gauguier D, Rorsman P: Progression of diet-induced diabetes in C57Bl6J mice involves functional dissociation of Ca²⁺ channels from secretory vesicles. *Diabetes*, 2010
45. Winzell MS, Ahren B: G-protein-coupled receptors and islet function-implications for treatment of type 2 diabetes. *Pharmacol Ther* 116:437-448, 2007
46. Nolan CJ, Prentki M: The islet beta-cell: fuel responsive and vulnerable. *Trends Endocrinol Metab* 19:285-291, 2008

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Body weight, energy intake and glycemia of C57Bl/6 mice fed normal (ND) or high fat diet (HFD) diet for 8 weeks. DIO mice were classified after 7.5 weeks on HFD as low- and high-HFD-responders (LDR and HDR) following body weight (BW) determinations. (A) Distribution plots of body weight at 7.5 weeks of ND or HFD of mice housed 3-4 per cage (ND, LDR and HDR) or individually (NDi and DIOi). Encircled symbol corresponds to DIO mice excluded from the study. (B) Fed glycemia and body weight of ND, LDR and HDR mice after 7.5 weeks of dietary treatment. (C) Weight and (D) energy intake curves of ND, LDR and HDR mice during 8 weeks of normal or HF diets. Inset (D) Mean of energy intake per week per group. (A) Means \pm SE of 52 mice for ND, LDR and HDR, of 13 and 33 mice for NDi and DIOi, respectively. (B) and (C) Means \pm SE of 136, 117, 148 mice for the ND, LDR and HDR groups, respectively. (D) Means \pm SE of 13, 14, 17 mice for the ND, LDR and HDR groups, respectively. ND *versus* LDR or HDR, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$; LDR *versus* HDR, $^{\$}P < 0.05$, $^{\$\$}P < 0.01$, $^{\$ \$ \$}P < 0.001$; one-way (B) or two-way ANOVA (C-D), Bonferroni post hoc test.

FIG. 2. DIO mice are insulin-resistant, glucose intolerant and have defective first phase GSIS. (A-B) Hyperinsulinemic euglycemic clamp (HIEC) in 2h-fasted anesthetised mice. (A) Arterial glucose levels at time 0 of the clamp; (B) glucose levels during the clamp. The dashed line corresponds to the clamped glucose value at ~ 7.2 mmol/L. (C) Glucose infusion rate during the last 30 min of the 2h HIEC (GIR) and (D) insulin sensitivity index (M/I) calculated as the glucose infusion rate (M) divided by the average insulinemia during the last 30 min of the clamp (I). M/I index is expressed as $\mu\text{mol.kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ glucose infused per pmol/L insulin. (E-I) Intravenous glucose tolerance test (IVGTT). Plasma glucose (E) and insulin (F) were measured at times 0, 3, 5, 15, 30, 45 and 60 min in response to a glucose challenge (*iv*; 0.5g/kg) in 16h-overnight fasted anesthetised mice; (G) Area under the curves (AUC) of the 0-60 min glycemic responses; (H) First phase insulin response to glucose (Glc) is the AUC of the 0-15 min insulinemic response; (I) Second phase insulin response to glucose is the AUC of the 15-60 min insulinemic response. Means \pm SE of 5-8

animals per group. ND *versus* LDR or HDR: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; LDR *versus* HDR: § $P<0.05$, §§ $P<0.01$, §§§ $P<0.001$; one-way (*A*, *C-D*, *G-I*) or two-way ANOVA (*B*, *E-F*), with Bonferroni post hoc test.

FIG. 3. Isolated islets from DIO mice show defective glucose-, KCl- and arginine-induced insulin release. Insulin secretion was measured in freshly isolated islets from ND, LDR and HDR mice. Group of 10 islets were incubated 1h in KRBH at 3, 8 or 16 mmol/L glucose (G; *A* and *D*) \pm 0.25 mmol/L palmitate/0.5% d-BSA (Pal; *B* and *D*) or 3 mmol/L glucose \pm 35 mmol/L KCl (*C*) \pm 0.25 mmol/L palmitate/0.5% d-BSA (Pal; *C*). Means \pm SE are of 14-16 determinations from islets of 21-22 animals per group in five (*A-B*, *D*) and three (*C*) separate experiments. (*E-H*) Insulin secretion by islets perifused at 3 mmol/L glucose (3G) or 16 mmol/L glucose (16G) with or without 10 mmol/L arginine (Arg). Area under the curve (AUC) for insulin over the first 15 min (*F*) and from 15-60 min (*G*) following glucose concentration increased from 3 to 16 mmol/L. AUC for maximal insulin secretion was determined from 60-80 min after arginine injection (*H*). Means \pm SE are of 6 ND, 7 LDR and 7 HDR. Insulin release in the media was determined after the 1h incubation or at the different time points of the perifusion experiment. * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ ND *versus* LDR or HDR; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, ### $P<0.001$ *versus* 3 mmol/L glucose (*A*) plus palmitate (*B*) or plus KCl (*C*) or *versus* the value in absence of palmitate (*D*) for the same group (ND, LDR, HDR), one-way ANOVA-Bonferroni's multiple comparison test.

FIG. 4. β -cell mass and proliferation, islet cell cytosolic free calcium, ATP, proinsulin, insulin and protein contents, and glucose metabolism of DIO mice. (*A*) β -cell mass and (*B*) proliferation as indicated by the number of Ki-67 positive β -cells/islet. Means \pm SE of 6 animals for ND and LDR and 7 for HDR. ND *versus* LDR or HDR, * $P<0.05$. One-way ANOVA with Dunnett's post hoc test. (*C*) Protein, (*D-E*) insulin expressed per islet (*D*) or per islet protein content (*E*) and (*F*) total islet proinsulin contents. Means \pm SE of 83, 35 and 9 animals per group for (*C*), (*D-E*) and (*F*), respectively. ND *versus* LDR or HDR, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$; LDR *versus* HDR, §§ $P<0.01$. One-way ANOVA with

Bonferroni post hoc test. Glucose utilization (*G*) and oxidation (*H*) were measured in islets incubated in KRBH at 3, 8 and 16 mmol/L glucose (*G*) with D-[U-¹⁴C]glucose and D-[5-³H]glucose. Means ± SE of 13-15 determinations from islets of 9 ND, 8 LDR and 10 HDR mice in three separate experiments. ###*P*<0.001 *versus* 3 mmol/L glucose for the same group. One-way ANOVA-Bonferroni's multiple comparison test. (*I*) Total ATP content was determined in islets incubated for 15 min in KRBH at 3 or 16 mmol/L glucose (*G*). Means ± SE of 13-15 determinations from islets of 9 ND, 9 LDR and 9 HDR mice in three separate experiments. #*P*<0.05 *versus* 3 mmol/L glucose for the same group. One-way ANOVA-Bonferroni's multiple comparison test. (*J*) Cytosolic free calcium was measured by confocal microscopy using Fluo-4 AM dye in dispersed-islet cells of ND, LDR and HDR mice. Cells were perfused for 3 min at 3 mmol/L glucose, then at 16 mmol/L glucose for 10 min and finally at 3 mmol/L glucose + 35 mmol/L KCl for 2 min. Fluorescence level is expressed in arbitrary units. For clarity purposes, the mean only of 6 independent experiments from 6 mice per group is represented. Of note, SE was no more than 15% at all time. One-way ANOVA with repeated measures, Tukey post test. ****P*<0.001 ND *versus* LDR and §§§*P*<0.001 LDR *versus* HDR.

FIG. 5. Altered lipid partitioning, lipolysis and glycerolipid/FA cycling in DIO islets. (*A*) Islet TG content. Means ± SE of 10-12 animals per group. (*B*) Glycerol release, as an index of lipolysis, was determined in islets incubated for 3h in KRBH at 3 and 16 mmol/L glucose (*G*). Means ± SE of 19-20 determinations from islets of 17-18 mice per group in four separate experiments. Islets were incubated in KRBH at 3 and 16 mmol/L glucose with [9,10-³H]palmitate to assess (*C*) FFA oxidation, (*D*) total intracellular labelled non-esterified FFA (NEFA), and (*E*) fatty acid esterification into triglycerides (TG) and (*F*) cholesterol esters (CE). Means ± SE of 9-12 determinations from islets of 14-18 mice per group in three (*C*) or four (*D-F*) separate experiments. (*G*) Total cholesterol (TC) and free cholesterol (FC) fractions extracted from ND, LDR and HDR islets. Means ± SE of 10-15 animals per group. LDR or HDR *versus* ND: **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001; LDR *versus*

HDR: $^{\S}P<0.05$; $^{\#}P<0.05$, $^{##}P<0.01$, $^{###}P<0.001$ *versus* 3 mmol/L glucose for the same islet group. One-way ANOVA-Bonferroni's multiple comparison test.

FIG. 6. Model depicting the possible mechanisms of β -cell failure to compensate for insulin resistance in HDR mice. In normal mice, an elevation of glucose leads to an increase in ATP/ADP ratio and intracellular Ca^{2+} and a decrease in fatty acid oxidation which allows long chain-acyl-CoA (FA-CoA) availability for glycerolipid/fatty acid (GL/FA) cycling which produces lipid signalling molecules (LSM), such as diacylglycerol, necessary for insulin secretion. Enhanced GL/FA cycling is an “on” signal for insulin secretion that contributes to the amplification arm of GSIS. Enhanced fat oxidation is an “off” signal for insulin secretion because it removes molecules from the cycle (46). In HDR mice, to adapt to the elevation of circulating FFA and post-prandial glucose and to prevent β -cell glucolipotoxicity and steatosis, fatty acid esterification processes and lipolysis are simultaneously decreased in association with enhanced FFA oxidation. The increase in FA oxidation, in parallel to depleting LSM, reduces FA-CoA availability for cholesterol ester (CE) synthesis, contributing with elevated blood cholesterol to free cholesterol accumulation and β -cell dysfunction with reduced secretion. Besides the amplification arm of GSIS, the classical triggering ATP/ Ca^{2+} pathway is also affected in HDR *versus* LDR mice due to reduced glucose stimulated ATP production and a lack of compensatory increase in the rise in Ca^{2+} promoted by high glucose. GPR40 activation by FFA may contribute to maintain high level of secretion and hyperinsulinemia. However, in the absence of insufficient insulin secretion for the demand due to the marked insulin resistance, HDR mice become hyperglycaemic. Black arrows indicated a difference between DIO group (LDR and HDR) and ND group. Striped arrows indicated a difference between HDR and LDR groups.

TABLE 1.**Metabolic parameters of C57Bl/6 mice fed with a normal or high-fat diet for 8 weeks.**

	FED			FASTED		
	ND	LDR	HDR	ND	LDR	HDR
Weight gain (g)	8.5±0.2 (62)	15.5±0.2 ^{***} (60)	20.4±0.2 ^{***,€€€} (72)	5.5±1.0 (5)	16.9±0.6 ^{***} (5)	21.0±0.3 ^{***,€€} (5)
Insulin (pmol/L)	252±24 (59)	266±20 (58)	658±54 ^{***,€€€} (67)	133±87 (5)	338±84 (5)	503±40 [*] (5)
ProIns (pmol/L)	18.5±2.3 (8)	23.7±1.9 (9)	31.8±4.0 [*] (9)	ND	ND	ND
ProIns/Ins (%)	7.8±1.3 (8)	9.4±1.4 (9)	5.5±0.9 [€] (9)	ND	ND	ND
FFA (mmol/L)	0.60±0.04 (33)	0.55±0.03 (33)	0.58±0.03 (38)	0.77±0.06 (5)	1.12±0.06 (5)	1.58±0.30 [*] (5)
TG (mmol/L)	0.41±0.02 (33)	0.32±0.01 ^{***} (34)	0.33±0.01 ^{***} (38)	0.36±0.04 (5)	0.40±0.04 (5)	0.39±0.03 (5)
TC (mmol/L)	1.50±0.07 (8)	1.90±0.14 (8)	2.58±0.21 ^{***,€} (8)	ND	ND	ND

Plasma triglyceride (TG), free fatty acids (FFA), total cholesterol (TC), proinsulin (ProIns) and insulin (Ins) were determined in anesthetized overnight fasted and/or fed male mice on a high-fat diet (LDR and HDR) or a standard chow diet (ND) for 8 weeks. Delta body weight represents the weight gain of mice since the introduction of diets (chow or HFD) at 6 weeks of age. Means ± SE of n animals as indicated in parentheses. LDR or HDR *versus* ND: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; HDR *versus* LDR: € $P<0.05$, €€ $P<0.01$, €€€ $P<0.001$. One-way ANOVA-Bonferroni's multiple comparison test. ND, not determined.

TABLE 2.

Summary of the metabolic and islet β -cell parameters obtained in C57Bl/6 male mice fed a high-fat diet for 8 weeks. TG, triglyceride, CE, cholesterol esters. Horizontal arrow, unchanged *versus* normal diet fed animals; arrows in parenthesis indicate a clear trend that did not reach statistical significance.

	LDR	HDR
Metabolic parameters		
Weight gain	↑	↑↑
Insulin resistance	↑	↑↑
Insulinemia	(↑)	↑↑
Proinsulinemia/insulinemia	↔	↔
OGTT glucose tolerance	(↓)	↓
ivGTT glucose tolerance	(↓)	↓
ivGTT/1 st phase GSIS	↓	↓↓
ivGTT/2 nd phase GSIS	↔	↔
Fasting FFA	(↑)	↑
Fed total cholesterol	(↑)	↑
Fed glycemia	↑	↑↑
2h-fasted glycemia	(↑)	↑
6h-fasted glycemia	↑	↑↑
16h-fasted glycemia	↔	(↑)
ivGTT, 1h glucose	↔	↑
OGTT, 2h glucose	(↑)	↑
Islet β-cell parameters		
β -cell mass	(↑)	↑
β -cell proliferation	(↑)	↑
Protein content/islet	↑	↑↑

Insulin content/islet	↔	↔
Proinsulin content/islet protein	↔	↔
Glucose-induced insulin secretion	↓	↓↓
KCl-induced insulin secretion	↓	↓
Glucose usage/oxidation	↔	↔
TG content	↔	↔
Free cholesterol content	↔	↑
Glucose-stimulated lipolysis	↓	↓
Glucose effect on NEFA content	(↓)	↓
Glucose effect on FA esterif. in TG	↓	↓
FA esterification in CE	↓	↓↓
FA oxidation	↔	↑
Glucose-induced ATP	↓	↓
Glucose-induced Ca ²⁺	↑	↔
KCl-induced Ca ²⁺	↔	↔

Figures:

Figure 1

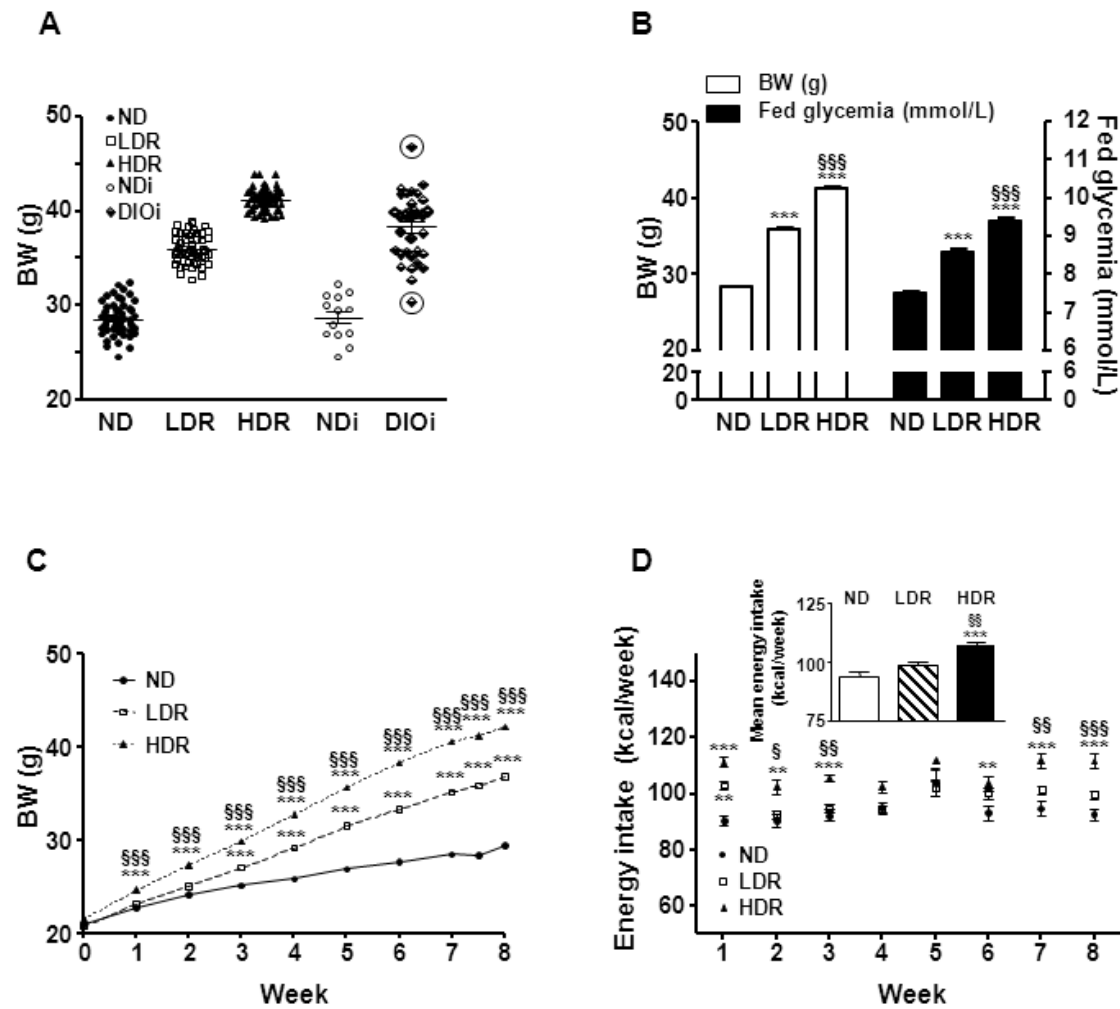


Figure 2

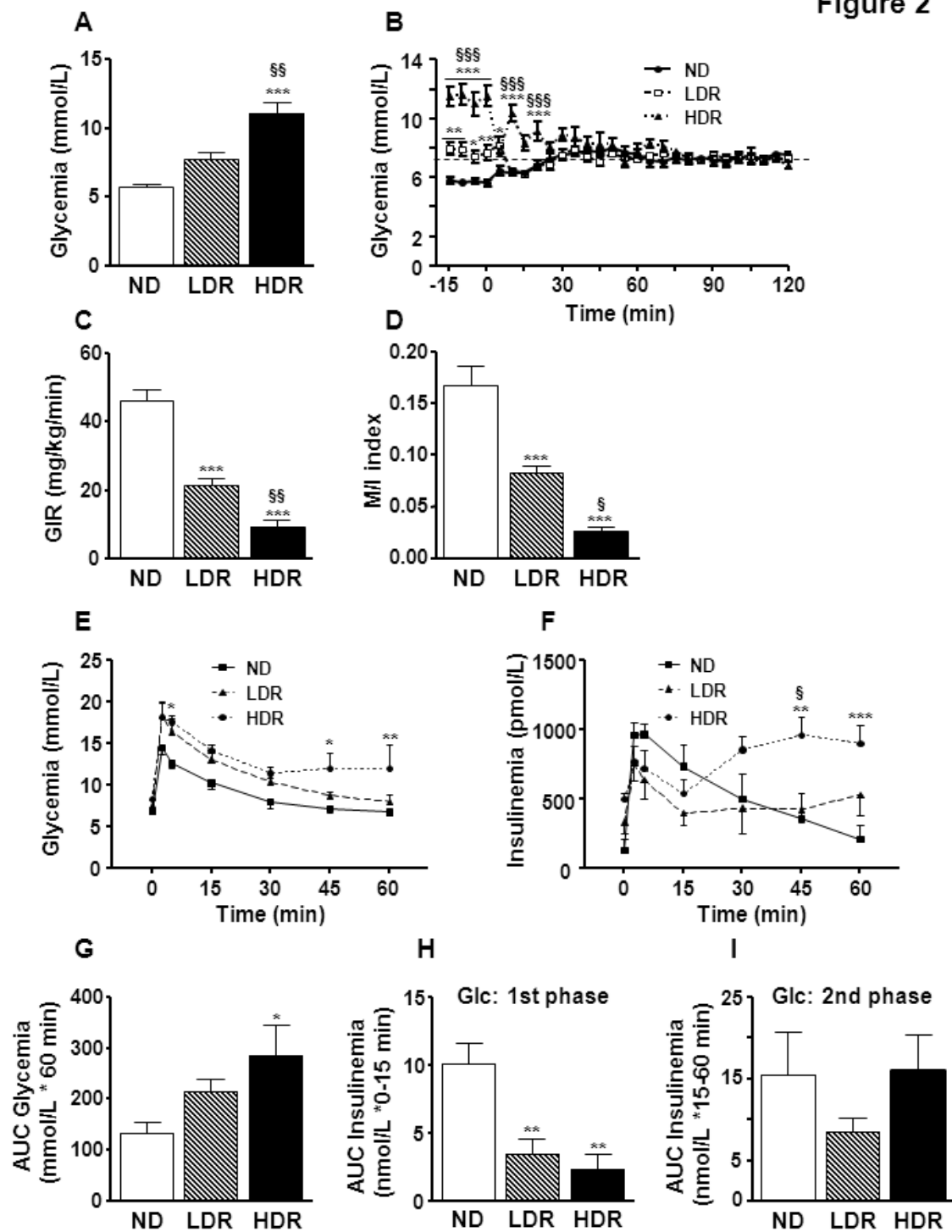


Figure 3

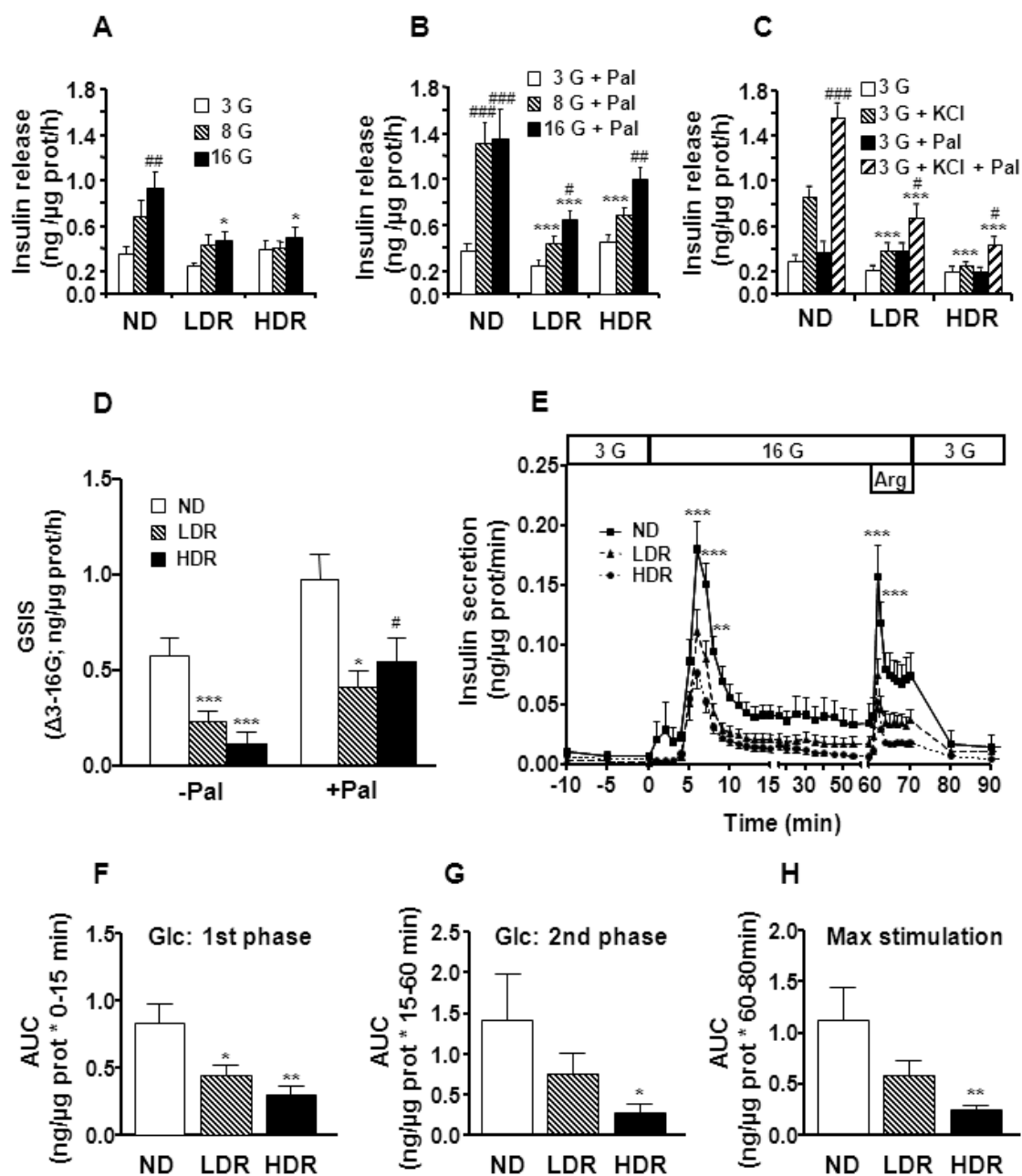


Figure 4

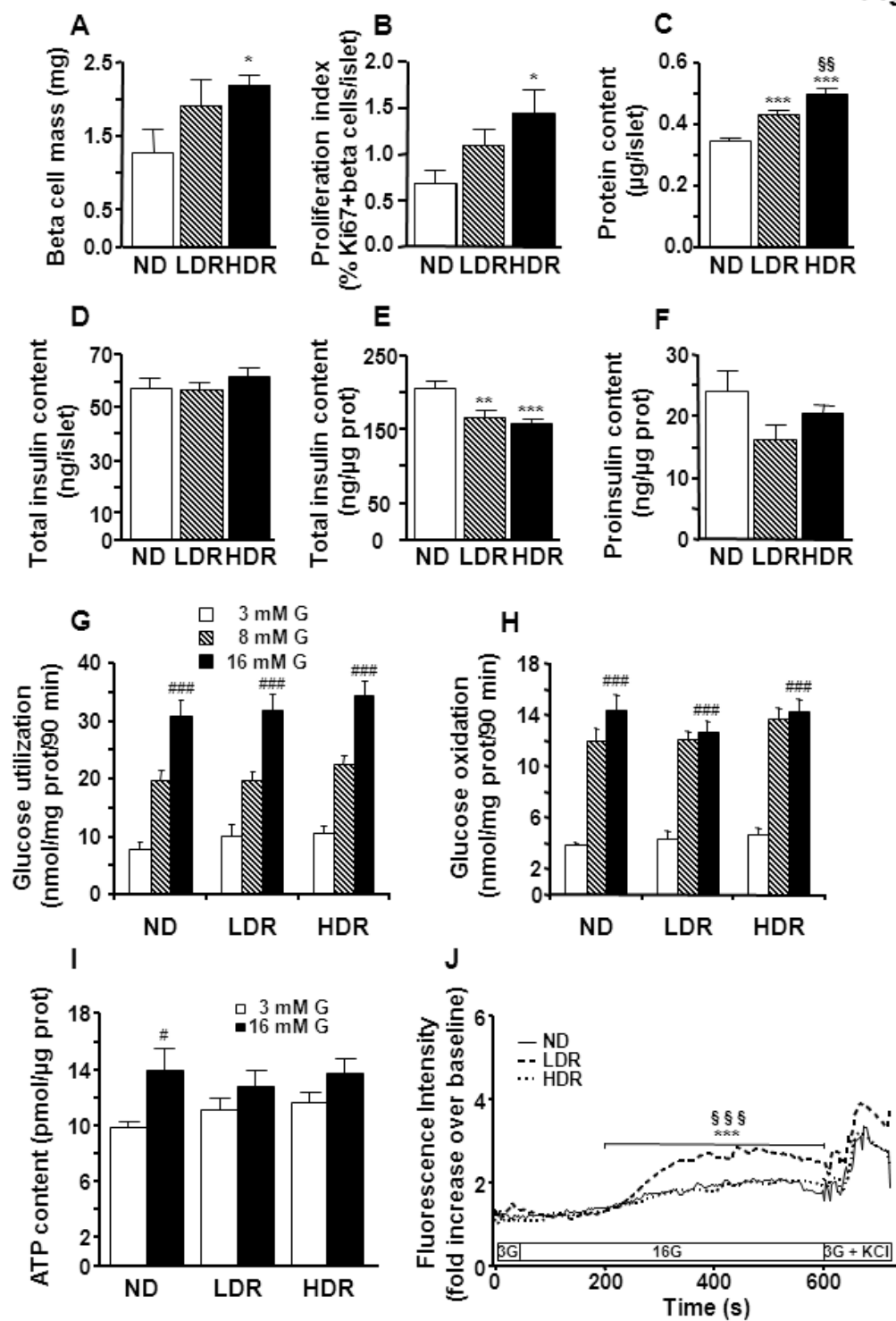


Figure 5

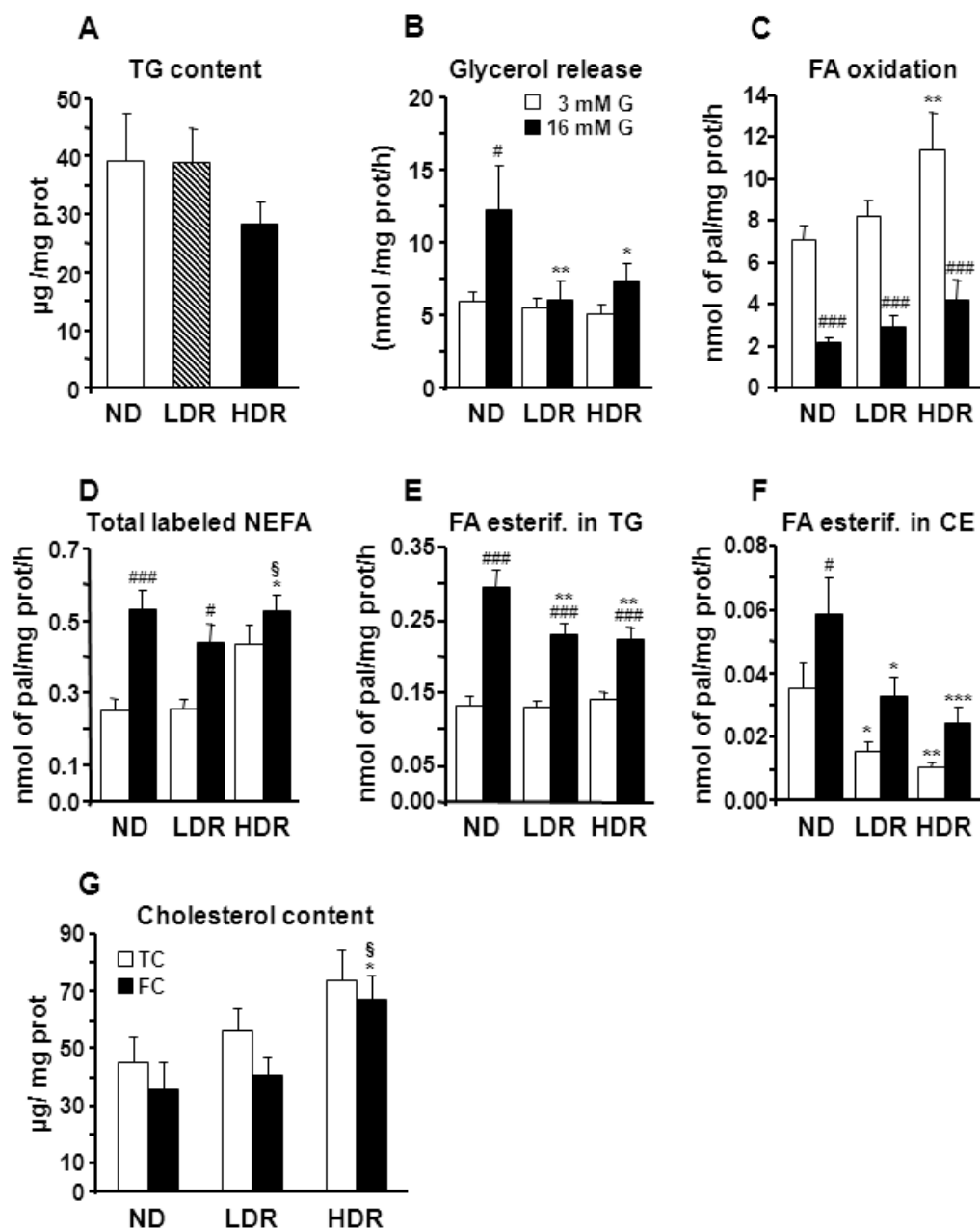
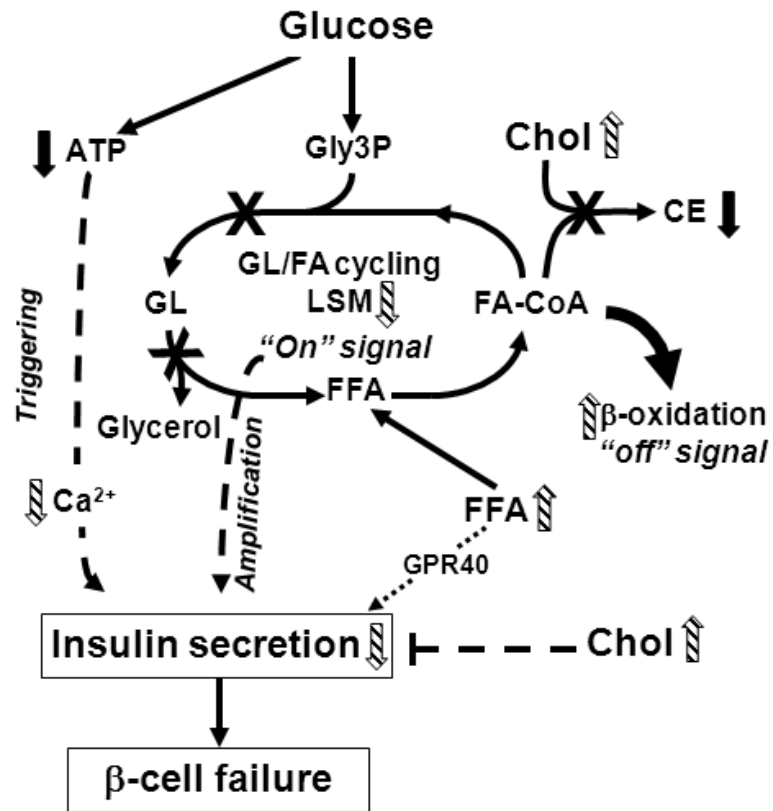


Figure 6



Supplemental research design and methods

Quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from islets as previously described (1). Gene expression was determined by a standard curve method and normalized to the expression of β -actin. Real-time PCR analysis was performed on Rotor-Gene R3000 (Corbett Research, Mortlake, NSW, Australia) using Quantitech Sybrgreen (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Primers, listed in supplementary Table 1, were designed using Primer3 software. Results are expressed as the ratio of target mRNA to β -actin mRNA.

Supplemental reference

1. Delghingaro-Augusto V, Nolan CJ, Gupta D, Jetton TL, Latour MG, Peshavaria M, Madiraju SR, Joly E, Peyot ML, Prentki M, Leahy J: Islet beta cell failure in the 60% pancreatectomised obese hyperlipidaemic Zucker fatty rat: severe dysfunction with altered glycerolipid metabolism without steatosis or a falling beta cell mass. *Diabetologia* 52:1122-1132, 2009

Supplemental figure legends

Suppl. Fig.1. Oral glucose tolerance in ND, LDR and HDR mice. (A-D) Oral glucose tolerance test (OGTT). Blood glucose (A) was measured at times 0, 15, 30, 60, 90 and 120 min in response to an oral glucose administration (1g/kg) in 6h-fasted mice. (B) Area under the curves (AUC) of the 0-120 min glycemic responses. (C-D) Blood glucose levels at time 0 (C) and a time 120 min (D) of the OGTT. Means \pm SE of 13-14 animals per group. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 ND *versus* LDR or HDR; § P <0.05, §§ P <0.01 LDR *versus* HDR; one-way (B-D) or two-way ANOVA (A), with Bonferroni post hoc test.

Suppl. Fig.2. mRNA expression of selected genes related to glucose and lipid metabolism. Gene expression was measured in islets from ND, LDR and HDR mice using real-time RT-PCR. Genes were grouped by function. (A) Glucose metabolism and transcription factors: forkhead box A2 (Foxa2/HNF-3 β), pyruvate carboxylase (PC), glucokinase (Gck), glucose

transporter 2 (GLUT-2), pancreas-duodenum homeobox-1 (PDX-1), v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A (Maf-A) and NK6 homeobox-1 (Nkx6.1). (B) Insulin biosynthesis and exocytosis: preproinsulin-2 (preproins), insulin-2 (Ins-2), synaptosomal-associated protein 25 (SNAP-25) and syntaxin-1a (STX-1a). (C) Fatty acid oxidation and lipolysis: peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α), PPAR- γ -coactivator-1 α and -1 β (PGC-1 α and -1 β), uncoupling protein-2 (UCP-2), malonyl-CoA-decarboxylase (MCD), carnitine palmitoyltransferase-1a (CPT-1a) and acyl-CoA oxydase-1 (ACOX-1), adipose triglyceride lipase (ATGL) and hormone-sensitive lipase (HSL). (D) lipogenesis: acetyl-CoA carboxylase-1 and -2 (ACC-1 and ACC-2), diacylglycerol-O-acyltransferase-1 (DGAT-1), glycerol-3-phosphate acyltransferase-1 (GPAT-1), stearoyl-CoA deasturase-1 (SCD-1), fatty acid transporter (FAT/CD36), lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT), sterol-O-acyltransferase (SOAT-1), liver-X-receptor- α and - β (LXR- α and - β), sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c) and PPAR- γ . Results are expressed as percent of the ND group values and were normalized to actin. Means \pm SE of 9-18 animals per group. LDR or HDR *versus* ND: * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001; LDR *versus* HDR: § P <0.05; one-way ANOVA-Bonferroni's multiple comparison test.

Supplemental Table 1

PCR primer sequences used for Quantitative Real Time PCR.

Primers: S, sense; AS, antisense.

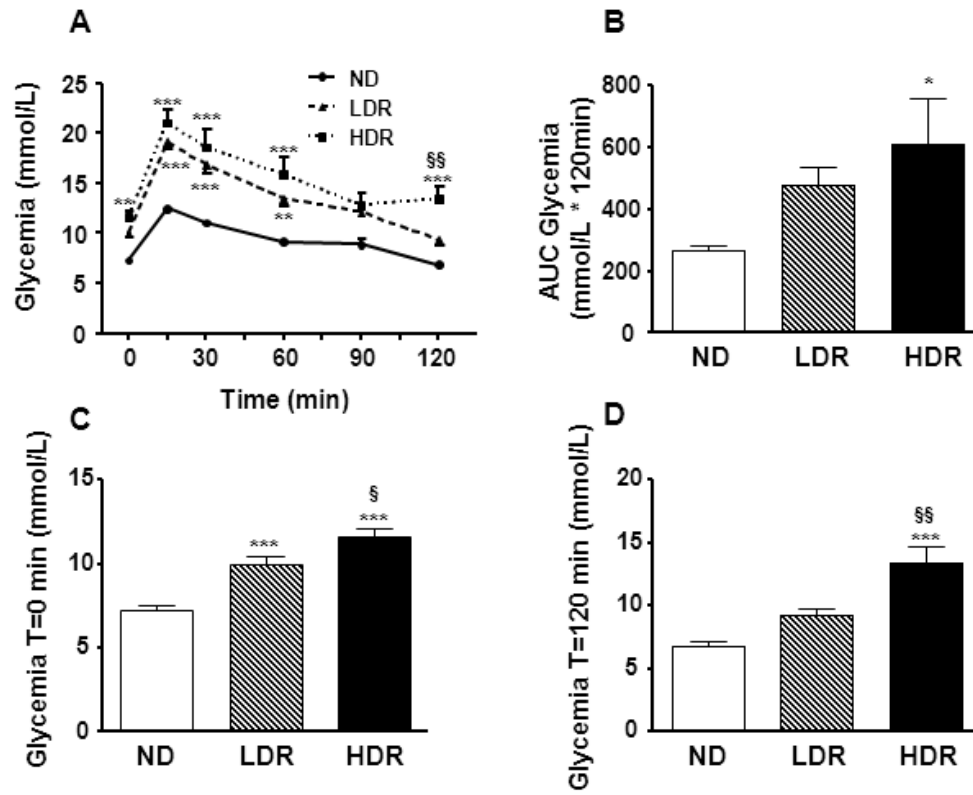
GENE	GenBank accession no	Primer sequences (5'-3')
ACC-1	NM_133360	S: ATGTCCGCACTGACTGTAACC AS: TCCATAGCCGACTTCCATAGC
ACC-2	NM_133904	S: GAAGCCTCCTTCGAGTACCTG AS: GAGGAAGATGTGGTTGCAGTC

<i>ACOX-1</i>	NM_015729	S: GCGTGGAACCTTGACTTCTGTC AS: ACGGCTCTGTCTTGAATCTTG
ATGL	NM_025802	S: TCCAAGGATGAGCTCATCCA AS: CCTCCTAAGGAATCGAAGTC
β-ACTIN	NM_007393	S: CATGGATGACGATATCGCTGC AS: GTACGACCAGAGGCATACAGG
CD36	NM_007643	S: AGGTCTATCTACGCTGTGTTCG AS: CAATGGTTGTCTGGATTCTGG
CPT1a	NM_013495	S: GGTTC AAGCTGTTCAAGATAGC AS: ACCACATAGAGGCAGAAGAGG
DGAT-1	NM_010046	S: GAGCTATCCAGACAACCTGACC AS: AGCATCTCAAGAACTCGTCGT
GCK	NM_010292	S: ATCTTCTGTTCCACGGAGAGG AS: GATGTTAAGGATCTGCCTTCG
GLUT-2	NM_031197	S: CTTGGTTCATGGTTGCTGAAT AS: GCAATGTACTGGAAGCAGAGG
GPAT-1	NM_008149	S: CGGAACTGAACTGGAGAAGTG AS: GATGAATTGCTGGTGCTCCTT
HNF-3β	NM_010446	S: CTACGCCAACATGAACTCGAT AS: GGTGATGAGCGAGATGTACGA
HSL	NM_001039507	S: GGCTCACAGTTACCATCTCACC AS: GAGTACCTTGCTGTCCTGTCC
INS-2	NM_008387	S: TGGAGGCTCTCTACCTGGTG AS: TCTACAATGCCACGCTTCTG
LCAT	NM_008490	S: GGCTGCACTCTATGAAGATGG AS: TGAGGTGATCTGTCTCGTTCA
LXR-α	NM_013839	S: GTTCTCCAGAGCCATGAATGA AS: GTTGCAGCCTCTCTACTTGGA

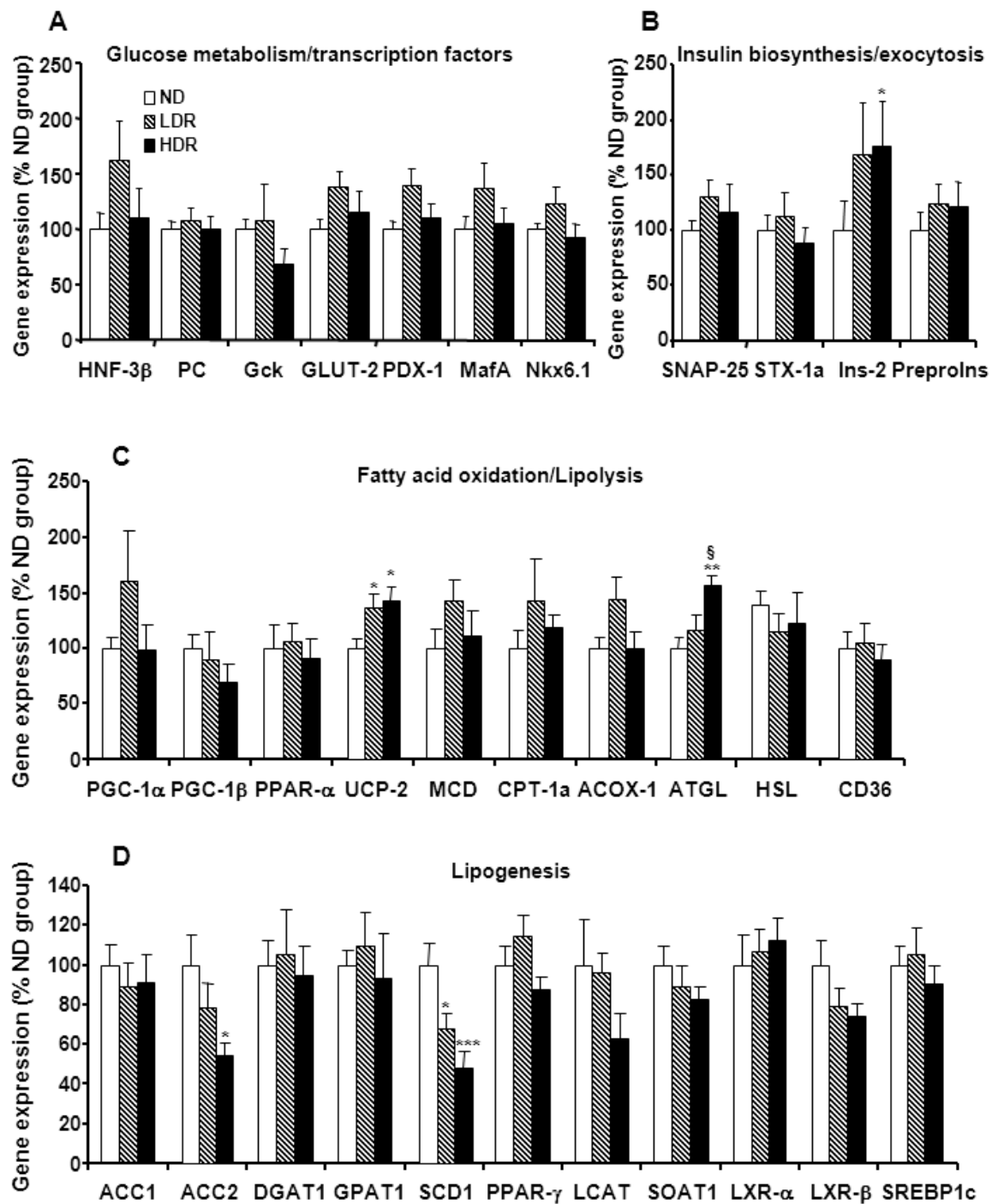
LXR-β	NM_009473	S: TCACCTACAGCAAGGACGACT AS: ATGGCGATAAGCAAGGCATAC
Maf-A	NM_194350	S: GTGCTGGAGGATCTGTACTGG AS: ATGGTGGTGATGGTGATGG
MCD	NM_019966	S: AGAAGATCAGCGAGTGTGAGG AS: AGTCAGAGCCACATGCAGAAC
Nkx6.1	NM_144955	S: CACGTTCTCTGGACAGCAAAT AS: TTGACCTGACTCTCCGTCATC
PC	NM_008797	S: TGA CTCTCTGCTCGTCAAGGT AS: AGGAACTGCTGGTTGTTGAGA
PDX-1	NM_008814	S: GGTATAGCCGGAGAGATGC AS: CTGGTCCGTATTGGAACG
PGC-1α	NM_008904	S: TAGAGTGTGCTGCTCTGGTTG AS: GATTGGTCGCTACACCACTTC
PGC-1β	NM_133249	S: GCTCTGGAAGGTGAAGACCTG AS: TCAAGCAGGAAGCTACTCTCG
PPAR-α	NM_011144	S: AGAGAATCCACGAAGCCTACC AS: GGCCATACACAAGGTCTCCAT
PPAR-γ	NM_011146	S: ATCAGCTCTGTGGACCTCTCC AS: GGTCAGCTCTTGTGAATGGAA
PREPROINS-2	NT_039437	S: CAGTGCCAAGGTCTGAAGGT AS: TGTGTCCATCCATGACCAGT
SCD-1	NM_009127	S: GAAGCTGGTGATGTTCCAGAG AS: CCAGAGTGTATCGCAAGAAGG
SNAP-25	NM_01142	S: ATGGAGAAGGCTGATTCCAAC AS: CCATGAGAGAAGCATGAAGGA
SOAT-1	NM_009230	S: CCACGGTTACAGCAAGAGTTC

		AS: TGGTGGCAGTGTGTATGCTAA
SREBP-1c	NM_011480	S: ATGCTCCAGCTCATCAACAAC AS: GAGGCCAGAGAAGCAGAAGAG
STX-1a	NM_016801	S: GTGAGGAATTGGAAGACATGC AS: GCCTTGCTCTGGTACTTGACG
UCP-2	NM_011671	S: AGAGCACTGTCGAAGCCTACA AS: AGGCAGAAGTGAAGTGGCAAG

Supplemental Figure 1



Supplemental Figure 2



Mise en contexte de l'article 3

La cause principale de la pandémie d'obésité qui survient actuellement dans le monde est une augmentation de la sédentarité des populations de concert avec une consommation excessive de nourriture riche en calories. L'obésité entraîne une augmentation du risque de développer entre autres des maladies cardiovasculaires ou le DT2 (*Bleich et al*, 2008).

Depuis les 20 dernières années, les mécanismes impliqués dans le développement du DT2, plus particulièrement sur la fonction de la cellule β , ont fait l'objet d'une attention grandissante. Il est maintenant clair que le métabolisme mitochondrial et le métabolisme des lipides jouent un rôle important dans la régulation de la sécrétion d'insuline (*Prentki et Nolan*, 2006; *Fex et al*, 2009; *Kruit et al*, 2010; *Robson-Doucette et al*, 2011; *Prentki et Madiraju*, 2012). De ce fait, un déséquilibre de ces mécanismes serait en cause dans le développement de la dysfonction de la cellule β et du DT2 chez l'homme.

La souris DIO est un modèle nutritionnel de progression vers le DT2. Dans l'article 2, nous avons mis en lumière une hétérogénéité du gain de masse corporelle des souris C57BL/6 soumise à une diète riche en gras. Nous avons donc séparé notre population DIO en répondants faibles (LDR) et forts (HDR) à la diète en ce qui a trait au gain de masse corporelle suite aux 8 semaines de diète. Nous avons démontré que la souris LDR développe une hyperglycémie légère et une atteinte métabolique intermédiaire alors que la souris HDR est plus hyperglycémique et montre les signes d'altérations métaboliques plus sévères. Les deux phénotypes démontrent une diminution de la SIIG, une diminution de la production d'ATP en réponse au glucose, et une perturbation marquée du métabolisme des lipides (*Peyot et al*, 2010).

L'AMPK étant un senseur de l'état énergétique de la cellule β activé par une augmentation des niveaux d'AMP, nous avons testé l'hypothèse selon laquelle la signalisation de cette voie est modifiée suite à une prise calorique supérieure chez les souris

DIO. De plus, le métabolisme mitochondrial des lipides (β -oxydation) étant augmenté chez les souris HDR, nous avons examiné si une dysfonction mitochondriale pouvait contribuer au défaut de SIIG. Enfin, des études récentes par le laboratoire du Dr Biden ont démontré que la protéine PKC ϵ serait importante dans la régulation négative de la SIIG en situation de dyslipidémie, plus particulièrement en altérant la lipolyse. Nous avons donc cherché à savoir si cette protéine est modulée par la diète riche en gras chez les souris DIO.

Article 3

Pancreatic β -cell dysfunction in a stratified model of diet-induced obesity: study of the role of AMP-kinase, protein kinase C ϵ and mitochondrial metabolism

Emilie Pepin, Marie-Line Peyot, Julien Lamontagne, Roxane Lussier, Marco Pineda, S.R. Murthy Madiraju, Erik Joly, Marc Prentki

Montreal Diabetes Research Center (MDRC), the Centre de Recherche du CHUM, Molecular Biology program and Departments of nutrition and biochemistry, University of Montreal, Montreal, Canada.

Running Title: β -cell dysfunction in the DIO mouse model involved increased PKC ϵ and decreased AMPK.

Publication: Manuscrit en préparation, qui sera soumis à la revue Diabetes, obesity and metabolism.

Contribution des co-auteurs :

E.Pepin a effectué la majorité des expériences et l'analyse des résultats, a contribué à l'élaboration du projet et à la rédaction du manuscrit.

M-L. Peyot a participé aux expériences, l'analyse des résultats et l'écriture du manuscrit.

J. Lamontagne a aidé au développement de la mesure de consommation d'O₂ et à l'isolation des îlots.

R. Lussier a participé aux expériences.

M. Pineda a participé aux expériences.

S.R.M. Madiraju a participé à l'analyse des résultats et à l'écriture du manuscrit.

E. Joly a participé à l'analyse des résultats.

M. Prentki a contribué à l'élaboration du projet, à l'analyse des résultats et à la rédaction du manuscrit.

Title:

Pancreatic β -cell dysfunction in a stratified model of diet-induced obesity: study of the role of AMP-kinase, protein kinase C ϵ and mitochondrial metabolism

Short title: β -cell dysfunction in the DIO mouse model.

Authors: *Émilie Pepin^{1,2}, Marie-Line Peyot¹, Julien Lamontagne^{1,4}, Roxane Lussier¹, Marco Pineda¹, S.R.Murthy Madiraju¹, Erik Joly¹, Marc Prentki^{1,3,4}*

Affiliation: ¹Montreal Diabetes Research Center (MDRC), the Centre de Recherche du CHUM, ²Program of Molecular Biology, ³Departments of Nutrition and ⁴Biochemistry, Faculty of Medicine, University of Montréal, Montreal, Québec, Canada

Corresponding author: Prof. Marc Prentki. Montréal Diabetes Research Center - CRCHUM, 2901 Rachel Street East, Rm 401, Montreal, QC, H1W 4A4, Canada. Phone: 1-514-890-8000 # 23642. Fax: 1-514-412-7648.

Keywords:

Diet-induced obesity; AMPK; PKC ϵ ; mitochondrial dysfunction; insulin secretion.

Abbreviations:

T2D: Type 2 diabetes; AMPK: AMP-activated protein kinase; PKC : protein kinase C; DIO : diet-induced obesity; ND: normal diet; LDR: low diet responder; HDR: high diet responder; GSIS: glucose-stimulated insulin secretion; FA: fatty acids; ACC: acetyl-CoA carboxylase; HMGCR: HMG-CoA reductase; UCP2: uncoupling protein 2; ROS: reactive oxygen species; HFD: high-fat diet; DAG: diacylglycerol; MAG: monoacylglycerol; FA-CoA: fatty acyl-CoA; GL/FFA cycle: glycerolipids/free fatty acid cycle.

Abstract:

The DIO mouse model stratified in low responders (LDR) and high responders (HDR) to the high fat diet allows the study of different phases in the development of type 2 diabetes (T2D). Previous work has shown that LDR mice have a milder β -cell dysfunction, while HDR mouse islets show more advanced metabolic perturbations. HDR vs LDR islets exhibit a more defective glucose-induced insulin secretion in association with additional alterations in islet lipid metabolism, notably an increase in free fatty acid oxidation and free cholesterol level. Islet glycerolipid/free fatty acid (GL/FFA) cycling is defective in both DIO groups. The goal of the present study was to gain insight into the molecular basis of β -cell failure in diabetes and the mechanisms responsible for altered β -cell function in DIO islet. O_2 consumption of LDR and HDR islet is unaltered, whereas only HDR islets show mitochondrial hyperpolarization in response to high glucose. The expression of islet protein kinase C ϵ , an enzyme thought to be implicated in the control of GL/FFA cycling, is elevated in both DIO groups. The phosphorylation state of AMP-kinase is markedly reduced in DIO islet, particularly in the HDR group. HDR islets have more elevated inactivated ACC and increased active HMGCR which can be correlated to the observed increase in β -oxidation and increased free cholesterol deposition, respectively. In conclusion, fuel surfeit induced alteration in AMPK and PKC ϵ signaling may contribute to β -cell dysfunction and the development of diabetes in the DIO mouse model.

Introduction:

The modern lifestyle characterized by unlimited access to high-caloric food and insufficient physical exercise is the main cause of obesity¹. It is associated with dyslipidemia and increased risk of complications such as cardiovascular disease, cancer or type 2 diabetes (T2D). T2D mellitus is caused by a glucose homeostasis deregulation due to insulin resistance of peripheral tissues and defective compensatory insulin secretion.

The study of genetic rodent models, such as the ob/ob and db/db mice, and the Zucker Diabetic Fatty (ZDF) rat highlighted the interconnection between insulin resistance and β -cell compensation in T2D²⁻⁴. More recently, β -cell specific knock-out mice have shown the importance of β -cell mitochondrial and lipid metabolisms⁵⁻⁹, as well as AMP-activated protein kinase (AMPK)¹⁰ and protein kinase C (PKC)¹¹ signaling pathways in the regulation of insulin secretion. Chronic lipid administration to pancreatic β -cells has been associated with decreased insulin gene expression^{12, 13} and insulin secretion^{14, 15}. A growing body of evidence points to dyslipidemia and excess fuel availability as the origin of β -cell dysfunction in T2D.

The diet-induced obese (DIO) mouse is a model of mild diabetes caused by excess caloric intake from high fat-containing diet that mimics the human modern lifestyle. The DIO mice gradually develops hyperglycemia¹⁶ and have a defective glucose-stimulated-insulin secretion (GSIS)^{17, 18}. A recent study by our group showed that not all C57BL/6 DIO mice have the same eating behavior, leading to an important heterogeneity in weight gain among the mice. Therefore, the DIO mice were stratified in two groups, the low diet responder (LDR) and the high diet responder (HDR), which provided a new model to study different phases in the development of T2D and obesity-linked β -cell dysfunction. The LDR mice have a mild phenotype showing β -cell compensation while the HDR mice, which gain the most weight, have a more advanced β -cell dysfunction showing greater metabolic and insulin secretion alterations. In comparison to human T2D, the LDR mice resemble 'pre-diabetes' while the HDR mice could be considered as 'early diabetic'. We have shown that, in accordance with previous studies^{16, 19-21}, the DIO mice are hyperglycemic and insulin resistant. However, while the LDR mice show increased protein content without apparent increase in β cell proliferation or mass, the HDR mice have hyperinsulinemia and decreased glucose tolerance, and partially compensate for the insulin resistance by increasing β -cell proliferation and mass. We observed in both LDR and HDR mice altered β -cell function with defective glucose- and KCl-stimulated insulin secretion, and an alteration in mitochondrial homeostasis indicated by a decrease in glucose-stimulated ATP content and an increase in uncoupling protein 2 (UCP2) expression. DIO islets have also

severe fatty acid (FA) metabolism alterations associated with β cell dysfunction: decrease in esterification and lipolysis and only in HDR mice an increase in FA oxidation and free cholesterol content that may in part explain the more altered GSIS of HDR vs LDR in vivo and ex vivo²². Thus, the comparison between LDR and HDR islets provides a unique model to identify the pathways responsible for early β -cell failure in the development of T2D.

In order to gain further insight into the molecular mechanisms responsible for altered β -cell function and defective GSIS in the DIO mouse model, we undertook to study pathways linking glucose, FA and energy metabolism to insulin secretion. Because islets from DIO mice are chronically exposed to fuel excess, we hypothesized that key pathways or enzymes important for energy metabolism could be affected. First of all, AMPK is known to be activated by decreased cellular energy level²³. It regulates FA oxidation and cholesterol metabolism through inhibitory phosphorylation of respectively acetyl-CoA carboxylase (ACC) and HMG-CoA reductase (HGMCR)²⁴, and its regulation of the expression of SIRT-protein family also influences acetylation of proteins as well as mitochondrial and fatty acid metabolism^{25, 26}. Thus, alteration in the AMPK signaling pathway could contribute to altered FA oxidation and free cholesterol levels observed in the HDR mice. Secondly, PKC ϵ has been associated with inhibition of lipolysis and consequently GSIS of FA-exposed islets¹¹. Since lipolysis and GSIS are downregulated in the DIO mouse islets, it suggests that PKC ϵ activity could be increased. Finally, an alteration in mitochondrial homeostasis could be caused by the increased UPC2 expression observed in DIO mouse islets, and could explain the reduced levels of glucose-induced ATP and concomitant reduced GSIS. Enhanced UCP2 levels could also alter ROS production since this protein appears to be implicated in ROS detoxification⁵. Interestingly, H₂O₂ may act as a coupling factor in GSIS²⁷. Overall, this study addresses the question as to how dyslipidemia can change β -cell signaling pathways for insulin secretion in a ‘pre-diabetic’ vs ‘early diabetic’ mouse model and how this altered signaling modulates GSIS.

Material and methods:

Material – Glucose-free RPMI 1640 media was purchased from Gibco (Burlington, ON). Fatty-acid free BSA and all chemicals, unless otherwise specified, were purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO). Rhodamine 123 was obtained from Molecular Probes (Burlington, ON). Cell culture supplies were purchased from Corning (NY, USA). Protein concentration determination for immunoblotting was performed using a BCA kit (Pierce, Rockford, IL, USA).

Animals and diets – Five-week old male C57BL/6 elite on a pure genetic background were purchased from Charles River Laboratories (Rawley, NC, USA). They were housed two per cages on a 12h light /dark cycle at 21°C with free access to water and standard diet (Teklad Global 18% protein rodent diet, 15% fat by energy, Harland Teklad, Madison, WI.). One week after arrival, mice were fed for 7 weeks with either the standard diet or HFD (Bioserv F-3282, 60% energy from fat, Frenchtown, NJ.). Body weight was measured weekly. Fed blood glucose was measured by portable glucometer (Contour, Bayer, Toronto, ON) at 6.5 weeks. All procedures were approved by the Institutional Committee for the Protection of Animals at the Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal.

Islet isolation and culture – Islets were isolated as described²⁸ with the exception that the enzyme Liberase TL (Roche Diagnostic, Laval, Qc) was used instead of collagenase XI. Islets were then incubated for 2h in RPMI complete medium supplemented with 10% FBS at 3 mM glucose for recovery.

Mitochondrial membrane potential – Isolated islets were dispersed by trypsinization and cultured overnight on glass coverslips coated with poly-lysine (Sigma-Aldrich, Oakville, ON) in RPMI 5.5 mM glucose. Islet cells were starved for 2h in RPMI complete medium 2.8 mM glucose and then loaded with 10µg/mL Rhodamine-123 in Krebs-Ringer bicarbonate buffer containing 10 mM HEPES (pH 7.4) (KRBH) supplemented with 2.8 mM glucose and 0.5% BSA. Fluorescence intensity was measured by confocal microscopy

following incubations at 3 mM and 16 mM glucose (G), and at 3 mM glucose + 25 μ M carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP).

Islet oxygen consumption measurements – Batches of 75 hand-picked islets were distributed to a 24-well Seahorse islet plate. Islets were preincubated for 40 min at 37°C without CO₂ in KRBH supplemented with 0.07% BSA and 3 mM glucose before loading in a XF24 respiratory machine (Seahorse Bioscience). Oxygen consumption was measured after stimulation with 3 mM and 16 mM glucose.

Immunoblotting – Isolated islets for total protein were washed three times with PBS, resuspended in protein lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.5, 1% NP40, 2 mM activated sodium orthovanadate, 4 mM EDTA, 10 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethanesulfonylfluoride) and snap-frozen in liquid nitrogen. Isolated islets for stimulated protein were incubated for 1h in KRBH containing 0.5% defatted BSA and 3 mM glucose. Islets were then incubated for 30 min in KRBH containing 0.5% defatted BSA and 3 or 16 mM glucose. Islets were then washed three times with PBS, resuspended in protein lysis buffer and snap-frozen in liquid nitrogen. Total protein extracts (15 μ g) from ND, LDR and HDR islets were separated on 4-15% gradient SDS-PAGE (Biorad) and transferred to PVDF-Immobilon membranes (Millipore, Billerica, MA). Membranes were probed with antibodies against total-AMPK α , phospho-Thr¹⁷² AMPK α , total-ACC, phospho-Ser⁷⁹ ACC, SIRT1, phospho-Ser⁸⁷² HMG-CoA reductase (Millipore, Billerica, MA), total-PKC ϵ and total-LKB1 (Santa Cruz Biotechnologies, Santa Cruz, CA). Tubulin (Abcam, Cambridge, MA) was used as a loading control. Signals were detected using a HRP-labeled anti-rabbit IgG (Bio-Rad, Mississauga, ON) and SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Thermo Scientific, Rockford, IL). Bands were quantified using Scion Image (Frederick, MD).

Statistical analysis – Data are expressed as mean \pm SEM. Statistical significance was calculated with two-tailed unpaired Student's *t* test or ANOVA with Tukey post hoc testing, as indicated. A *p* value of <0.05 was considered significant.

Results:

Lack of decrease in mitochondrial function in DIO islets

Mitochondria integrate and generate metabolic signals to ensure appropriate insulin secretion in response to fluctuating glucose concentrations. Studies in various mouse models of T2D²⁹⁻³¹ and human islets from T2D donors³² revealed that mitochondrial dysfunction is associated with reduced insulin secretion and development of T2D³³. A recent study implicated UCP-2 as a regulator of β -cell reactive oxygen species (ROS) level that modulates GSIS⁵. Since we previously found increased UCP-2 mRNA expression and decreased glucose-stimulated ATP levels in LDR and HDR islets²², we assessed mitochondrial function to determine whether it could be implicated in altered GSIS in DIO islets. First, mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_{\text{mito}}$) measurements showed that HDR islets were hyperpolarized in response to 16 mM glucose while LDR $\Delta\psi_{\text{mito}}$ was similar to that of normal diet (ND) islets (Fig 1A). We then examined if this is associated with changes in glucose-induced O₂ consumption. O₂ consumption measurements in isolated islets revealed no change in basal and glucose-induced O₂ consumption in islets of high-fat fed mice relative to ND islets (Fig 1B). Our previous work also showed similar glucose oxidation to CO₂ in ND and DIO islets²². Overall, our observations do not indicate a major mitochondrial dysfunction in HDR or LDR islets but do not discount more subtle changes in uncoupling or ROS production.

Altered AMPK signaling in the DIO islets

AMPK activity is regulated in part by cellular AMP levels and by upstream kinases²³. Its activation has been associated with an increase in FA oxidation and decreased cholesterol biosynthesis by inactivation of ACC³⁴ and HMGCR³⁵ respectively. Increased AMPK activity was also linked in isolated islets with decreased GSIS³⁶ and lipolysis³⁷. As our earlier studies indicated that glucose-induced ATP production is lowered in DIO mouse islets and because AMP/ATP ratio is important in the regulation of AMPK, we next checked the effect of high fat diet on islet AMPK expression and activity. Considering that HFD treatment causes fuel overload and that we observed reduced lipolysis and GSIS in both LDR and HDR islets, as well as increased FA oxidation and accumulation of free

cholesterol in HDR islets²², we also measured the levels of key proteins of the AMPK signaling pathway. We observed a significant increase in AMPK α protein level in the HDR mice (Fig 2D) but no change in the total protein levels of two AMPK targets, ACC and SIRT1 (Fig 2A and B), or its upstream kinase LKB1 (Fig 2C). We then measured as an index of AMPK activity phosphorylated AMPK levels in islets in response to increasing glucose concentration, and correlated AMPK activity with GSIS. In both ND and LDR islets, we observed that AMPK phosphorylation is decreased at elevated glucose concentration (16 mM), as shown previously³⁷. However, in the HDR mouse islets, basal AMPK phosphorylation at 3 mM glucose itself is decreased significantly in comparison to both ND and LDR mouse islets and there was no significant decrease in AMPK phosphorylation by elevated glucose levels (Fig 2E). Decreased basal AMPK phosphorylation is also seen in the LDR group as compared to ND mouse islets, although it did not reach statistical significance, and this change is much less prominent than in HDR islets. Therefore, the basal activity of the islet AMPK pathway is decreased by the high fat diet and this effect is marked in HDR islets such that there is an almost loss of glucose-regulated AMPK activity in this group (Fig 2F).

We also measured the phosphorylation levels of two AMPK target proteins: ACC and HMGCR (an index of their activity since phosphorylation by AMPK reduces their activities). First, we observed that the phosphorylation state of ACC in the various islet groups does not match the changes observed for phosphorylated AMPK (Fig 2G). Moreover, while ACC phosphorylation is similar at low and high glucose in ND and LDR islets, we observed an increase in ACC phosphorylation at high glucose in HDR islets. Second, HMGCR phosphorylation levels in ND islets indicate that the phosphorylation of this protein is not regulated by glucose in this tissue (Fig 2H). We also observed that HMGCR phosphorylation is similar in ND and LDR. However, HDR islets show a prominent 50% decrease in HMGCR phosphorylation levels, which correlate with the decreased phosphorylated AMPK in this group.

Increased PKC ϵ expression in DIO islets

PKC ϵ is thought to be a negative regulator of insulin secretion. A study by Cantley *et al* demonstrated that PKC ϵ -KO islets have increased GSIS and lipolysis after prolonged (48-72h) exposure to elevated levels of FA¹¹. Since we observed a decreased GSIS and lipolysis in the DIO islets²², we examined the expression levels of PKC ϵ . We found that the protein levels were increased more than two fold in LDR and HDR islets in comparison with ND islets (Fig 3).

Discussion:

In the β -cell, mitochondrial metabolism integrates signals from glucose, fatty acids and amino acids to illicit proper insulin release. As fuels are oxidized, reducing equivalents provide electrons to the electron transport chain, causing mitochondrial membrane hyperpolarization which drives ATP production by the ATP synthase³⁸. Mitochondria from diabetic patients show both structural and functional abnormalities³⁹, which could probably lead to alteration in mitochondrial function and metabolism. Because of the severe perturbations in FA metabolism observed in the DIO islets²², and in order to better understand the metabolic pathways underpinning the secretory dysfunction in these islets, mitochondrial homeostasis parameters were measured. A decrease in glucose-induced ATP content was observed in LDR and HDR islets²². This decrease could be caused by three mechanisms: first, a decrease in the proton flux to the mitochondrial inter-membrane space; second, an increase in uncoupling; or third, a decrease in ATP synthase activity (Fig 4).

Firstly, $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ results indicating HDR mitochondrial hyperpolarization at high glucose should be discussed²². It could reflect more proton pumping out of the mitochondria for more ATP production. As such it could reflect a compensation mechanism by which the HDR islets try to secrete more insulin to face increased insulin resistance, and to compensate another defect in the GSIS process. Alternatively it could be due to fewer protons reentering the mitochondrion via ATP synthase complex (see below) with resulting

reduced ATP production. Interestingly, Wikstrom *et al*⁴⁰ observed an increased number of hyperpolarized mitochondria following a 24h glucolipotoxic treatment of dispersed islet β -cells, suggesting that hyperpolarization could be associated with β cell dysfunction under certain conditions. Also, we observed that HDR islets show an increase in FA oxidation compared to LDR and ND, without a change in glucose oxidation²², which could lead to an increase in the shuttling of protons into mitochondrial inter-membrane space. This could explain the increase in $\Delta\psi_{\text{mito}}$ observed in the HDR islets, but does not explain the decrease in glucose-induced ATP levels seen in LDR and HDR islets.

Secondly, could this decrease in the glucose induced rise in ATP levels be attributed to increased mitochondrial uncoupling? This was suggested by the observed elevated UCP2 mRNA expression levels in DIO islets²². However, a recent publication revealed that UCP2 may not be a mitochondrial uncoupler but rather would control ROS generation in β cell⁵, suggesting that increase in UCP2 does not lead to uncoupling. Moreover, we observe normal glucose-induced respiration in DIO islets, which would be expected to be increased with mitochondrial uncoupling. Unchanged respiration has also been observed in hepatocytes of HFD-fed rats, so it seems than changing the respiratory capacity is not a mechanism by which HFD changes the homeostasis of the cell⁴¹. Therefore, with the state of our present data we have no evidence of increased uncoupling of islet cells induced by the HFD. However, to be conclusive in subsequent study we should directly measure ATP production and uncoupling in isolated islets at low and high glucose by measuring O_2 consumption of islets in the absence and presence of oligomycin which inhibits ATP synthase and antimycin plus rotenone which inhibit complexes of the electron transport chain.

Thirdly, the enhanced mitochondrial polarization of HDR islets and the decrease in glucose-stimulated ATP levels in DIO islets could be due to a diminution in ATP synthase activity (with less proton reentering the mitochondrion). Interestingly, a study of lean, insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes has shown an increase in intramyocellular lipid levels associated with a decrease in ATP production⁴². Therefore, the possibility also exists that the decrease in glucose-induced rise in ATP levels originates

from a decrease in ATP synthesis. The measurement of ATP synthase activity could provide further evidence in how increased $\Delta\psi_{\text{mito}}$ translates into decreased ATP in the DIO islets.

Altered mitochondrial ROS production could also contribute to β -cell dysfunction in DIO islets. Notably, a growing body of evidence suggests a role for ROS as ‘second-messenger signal’ to regulate GSIS⁴³, and UCP2 would act as a negative regulator of mitochondrial-derived ROS^{5, 44-46}. However, despite a large number of *in vitro*⁴⁴ and *in vivo*^{5, 45, 46} studies, there is still controversy about the effect of UCP2 on the regulation of GSIS and the absence of specific and reliable tools to measure different reactive oxygen species leaves this question unanswered.

Thus, as a continuation of this work and to conclusively determine whether DIO islets show some mitochondrial dysfunction or altered ROS production, in future studies we will directly measure uncoupling, ATP production and ROS levels in the islets of normal and high fat fed mice.

The energy sensor protein AMPK is activated either by Ca^{2+} -dependent pathways, or by an increase in the AMP/ATP ratio (hypoxia, decrease fuels)⁴⁷. Its role is to activate energy-producing and to inactivate energy-consuming pathways by altering protein activity or gene expression²³. AMPK phosphorylation inactivates ACC and HMGCR to promote FA β -oxidation²⁴ and reduce cholesterol biosynthesis⁴⁸, respectively. AMPK activation has been associated with reduced GSIS in β -cells and islets^{36, 49} and with reduced β -cell proliferation⁵⁰. Among the islet proteins of the AMPK signaling pathway that we have examined, AMPK itself is the one most changed by the HFD. Despite an increase in the total AMPK protein level in DIO islets, the AMPK activity (as indicated by its phosphorylation state) is decreased in LDR islets and even more in HDR islets. This suggests that the portion of active AMPK relatively to the total pool of the protein is gradually declining as the β cell dysfunction worsens. Moreover, as a consequence of the reduced basal activity, the glucose-regulated AMPK activity is largely lost in the HDR islets, which correlates with the more defective GSIS in HDR compared to LDR islets. We also observed dissociation between AMPK phosphorylation and ACC phosphorylation

which is unique to the HDR islets. Interestingly, such dissociation has also been observed in normal muscle undergoing prolonged exercise, where there is a shift in fuel utilization from glucose to FA^{51, 52}. The reason for this dissociation is unclear. Maybe unphosphorylated AMPK shows some activity and because total AMPK level is increased in the HDR islets, perhaps the higher total AMPK level explains this dichotomy. Nevertheless, the increased ACC phosphorylation state in HDR islets is indicative of a decrease in malonyl-CoA production that would favor an increase in β -oxidation as we previously observed²². Moreover, it has been shown that the protein phosphatase PP2a is induced by glucose⁵³ and would activate ACC in β cells⁵⁴. It would be relevant to verify whether PP2a activation by glucose is modulated by HFD and could explain the dissociation of the AMPK/ACC signaling pathway. On the other hand, even though glucose regulates AMPK activity and HMGCR activity is regulated by AMPK, we observed that HMGCR phosphorylation i.e. activity is not regulated by glucose in islets. In addition, we observed in HDR islets that the enhanced activity of HMGCR, as evidenced from the reduced phosphorylation state, possibly due to the inhibition of the AMPK pathway, is a unique feature of this islet group. This could contribute to the increase in cholesterol levels observed in those islets²².

Overall, the results show a pronounced alteration in AMPK signaling and two of its key target enzymes (ACC and HMGCR) in HDR islets. The observed changes in ACC and HMGCR phosphorylation fit with our previous observation of enhanced fat oxidation and enhanced free cholesterol deposition in “early-diabetic” HDR islets²². However, changes in phosphorylation of other AMPK targets such as lipases could contribute to the additional alterations in lipogenesis, lipolysis²² and GSIS (Fig 4). Interestingly, increased cholesterol levels in β -cell decreases insulin exocytosis and membrane fluidity⁸. We suggest that this increase in cholesterol levels observed in the β cell could participate to the very defective GSIS and β -cell failure of HDR mice. Thus, we hypothesize that chronic reduction in basal AMPK activity plays a causal role in β -cell dysfunction of DIO islets by promoting alterations in lipid metabolism (cholesterol synthesis, lipogenesis and lipolysis pathways). The reduced AMPK activity could also be responsible for the enhanced β -cell mass of the

HDR islets²² since AMPK activity is inversely correlated with cell growth in various systems^{55, 56} including the β -cell⁵⁷. The latter needs further investigation in DIO islets in our laboratory.

FA metabolism in the pancreatic β -cell is known to potentiate GSIS. In fact, through the glycerolipid/free fatty acid (GL/FFA) cycle, production of lipid-signaling molecules (eg.: DAG, MAG, FA-CoA) is thought to activate different signaling cascades⁵⁸. The identity of those molecules and their mode of action are still misunderstood, but it has been well established that alteration of the GL/FFA cycle affect GSIS^{9, 28, 59, 60}. Moreover, altered FA partitioning from esterification to β -oxidation has emerged as a protective mechanism against the toxic effects of FA accumulation, decreasing the intracellular level of lipid signaling molecules and therefore insulin secretion, and thus preventing β -cell exhaustion. Members of the PKC family are activated by increased DAG levels. PKC ϵ has been recently identified as a negative regulator of FA lipolysis and GSIS in conditions of excess lipids in pancreatic β -cells¹¹. PKC ϵ -KO mice fed a high-fat diet show increased insulin secretion with improvement of glucose-regulated lipid partitioning in the β -cell⁶¹. In the DIO model, the decrease in GSIS is associated with a decreased GL/FFA cycling, and a concomitant increase in β -oxidation in the HDR islets²². Interestingly, we observed a two-fold increase in PKC ϵ levels in LDR and HDR islets. This suggests a possible implication of PKC ϵ in the early changes leading to the secretory dysfunction and altered lipid partitioning observed in both LDR and HDR islets (Fig 4). Experiments with PKC ϵ inhibitor or molecular tools should be used to directly test this possibility. It also reinforces the hypothesis of Cantley *et al* that PKC ϵ could act as a negative regulator of GSIS in presence of FA. DAG level quantification in DIO islet could help in the determination of the mechanism(s) involved in defective GSIS observed in high fat fed mice since many PKC enzymes, in particular PKC ϵ are activated by DAG. It should be noted that PKC ϵ targets related to insulin secretion are currently not well established. It is therefore still unclear how PKC ϵ regulates GSIS and lipid metabolism.

In conclusion (see Fig 4), this study shows that β -cell failure in HDR DIO islets is associated at basal glucose with a very pronounced reduction in AMPK phosphorylation state, an index of AMPK activity. This likely explains the lack of glucose responsiveness of the enzyme. The chronically reduced AMPK activity may be causal in inducing a number of observed alterations or changes in DIO-HDR islets, including reduced HMGCR phosphorylation and free cholesterol production, as well as enhanced β -cell growth. Our current work does not show major alterations in mitochondrial metabolism in HDR islets but further study is required to determine if more subtle changes in mitochondrial uncoupling, ATP production or ROS levels occur in these islets. Finally, we observed an enhanced expression level of PKC ϵ in DIO islets that could be linked to altered TG/FFA cycle and lipolysis in DIO islets. Additional work is required to directly test this view.

Acknowledgements:

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (to M.P. and M.M.). M.P. is the recipient of a Canadian Chair in Diabetes and Metabolism. E.P. was supported by graduate studentships from Diabète Québec and Université de Montréal. No other potential conflicts of interest relevant to this article were reported.

E.P. and M.-L.P. researched data, contributed to discussion, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript. J.L., R.L. and M.Pi. researched data. E.J. contributed to discussion. S.R.M.M. contributed to discussion and reviewed/edited the manuscript. M.Pr. contributed to discussion, wrote the manuscript, and reviewed/edited the manuscript

References:

1. Bleich S, Cutler D, Murray C, Adams A. Why is the developed world obese? *Annu Rev Public Health*. 2008; 29: 273-95.
2. Pelleymounter MA, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science*. 1995; 269 (5223): 540-3.
3. Like AA, Chick WL. Studies in the diabetic mutant mouse. I. Light microscopy and radioautography of pancreatic islets. *Diabetologia*. 1970; 6 (3): 207-15.
4. Lavine RL, Chick WL, Like AA, Makdisi TW. Glucose tolerance and insulin secretion in neonatal and adult mice. *Diabetes*. 1971; 20 (3): 134-9.
5. Robson-Doucette CA, Sultan S, Allister EM, Wikstrom JD, Koshkin V, Bhattacharjee A, Prentice KJ, Sereda SB, Shirihai OS, Wheeler MB. β -Cell Uncoupling Protein 2 Regulates Reactive Oxygen Species Production, Which Influences Both Insulin and Glucagon Secretion. *Diabetes*. 2011; 60 (11): 2710-9.
6. Srinivasan M, Choi CS, Ghoshal P, Pliss L, Pandya JD, Hill D, Cline G, Patel MS. ss-Cell-specific pyruvate dehydrogenase deficiency impairs glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2010; 299 (6): E910-7.
7. Liu Y, Tanabe K, Baronnier D, Patel S, Woodgett J, Cras-Meneur C, Permutt MA. Conditional ablation of Gsk-3 β in islet beta cells results in expanded mass and resistance to fat feeding-induced diabetes in mice. *Diabetologia*. 2010; 53 (12): 2600-10.
8. Kruit JK, Kremer PH, Dai L, Tang R, Ruddle P, de Haan W, Brunham LR, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and cholesterol uptake via the LDL receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice. *Diabetologia*. 2010; 53 (6): 1110-9.
9. Fex M, Haemmerle G, Wierup N, Dekker-Nitert M, Rehn M, Ristow M, Zechner R, Sundler F, Holm C, Eliasson L, Mulder H. A beta cell-specific knockout of hormone-sensitive lipase in mice results in hyperglycaemia and disruption of exocytosis. *Diabetologia*. 2009; 52 (2): 271-80.

10. Sun G, Tarasov AI, McGinty JA, French PM, McDonald A, Leclerc I, Rutter GA. LKB1 deletion with the RIP2.Cre transgene modifies pancreatic beta-cell morphology and enhances insulin secretion in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2010; 298 (6): E1261-73.
11. Cantley J, Burchfield JG, Pearson GL, Schmitz-Peiffer C, Leitges M, Biden TJ. Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse beta-cells. *Diabetes.* 2009; 58 (8): 1826-34.
12. Ritz-Laser B, Meda P, Constant I, Klages N, Charollais A, Morales A, Magnan C, Ktorza A, Philippe J. Glucose-induced preproinsulin gene expression is inhibited by the free fatty acid palmitate. *Endocrinology.* 1999; 140 (9): 4005-14.
13. Hagman DK, Hays LB, Parazzoli SD, Poitout V. Palmitate inhibits insulin gene expression by altering PDX-1 nuclear localization and reducing MafA expression in isolated rat islets of Langerhans. *J Biol Chem.* 2005; 280 (37): 32413-8.
14. Dubois M, Kerr-Conte J, Gmyr V, Bouckenooghe T, Muharram G, D'Herbomez M, Martin-Ponthieu A, Vantyghem MC, Vandewalle B, Pattou F. Non-esterified fatty acids are deleterious for human pancreatic islet function at physiological glucose concentration. *Diabetologia.* 2004; 47 (3): 463-9.
15. Zhou YP, Grill VE. Long-term exposure of rat pancreatic islets to fatty acids inhibits glucose-induced insulin secretion and biosynthesis through a glucose fatty acid cycle. *J Clin Invest.* 1994; 93 (2): 870-6.
16. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes.* 1988; 37 (9): 1163-7.
17. Lee SK, Opara EC, Surwit RS, Feinglos MN, Akwari OE. Defective glucose-stimulated insulin release from perfused islets of C57BL/6J mice. *Pancreas.* 1995; 11 (2): 206-11.
18. Wencel HE, Smothers C, Opara EC, Kuhn CM, Feinglos MN, Surwit RS. Impaired second phase insulin response of diabetes-prone C57BL/6J mouse islets. *Physiol Behav.* 1995; 57 (6): 1215-20.

19. Collins SC, Hoppa MB, Walker JN, Amisten S, Abdulkader F, Bengtsson M, Fearnside J, Ramracheya R, Toye AA, Zhang Q, Clark A, Gauguier D, Rorsman P. Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca²(+) channels from secretory vesicles. *Diabetes*. 2010; 59 (5): 1192-201.
20. Fearnside JF, Dumas ME, Rothwell AR, Wilder SP, Cloarec O, Toye A, Blancher C, Holmes E, Tatoud R, Barton RH, Scott J, Nicholson JK, Gauguier D. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. *PloS one*. 2008; 3 (2): e1668.
21. Surwit RS, Seldin MF, Kuhn CM, Cochrane C, Feinglos MN. Control of expression of insulin resistance and hyperglycemia by different genetic factors in diabetic C57BL/6J mice. *Diabetes*. 1991; 40 (1): 82-7.
22. Peyot ML, Pepin E, Lamontagne J, Latour MG, Zarrouki B, Lussier R, Pineda M, Jetton TL, Madiraju SR, Joly E, Prentki M. Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes*. 2010; 59 (9): 2178-87.
23. Ruderman N, Prentki M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nat Rev Drug Discov*. 2004; 3 (4): 340-51.
24. Merrill GF, Kurth EJ, Hardie DG, Winder WW. AICA riboside increases AMP-activated protein kinase, fatty acid oxidation, and glucose uptake in rat muscle. *Am J Physiol*. 1997; 273 (6 Pt 1): E1107-12.
25. Balcerczyk A, Pirola L. Therapeutic potential of activators and inhibitors of sirtuins. *Biofactors*. 2010; 36 (5): 383-93.
26. Lomb DJ, Laurent G, Haigis MC. Sirtuins regulate key aspects of lipid metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1804 (8): 1652-7.
27. Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007; 56 (7): 1783-91.
28. Peyot ML, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, Ruderman NB, Haemmerle G, Zechner R, Joly E, Madiraju SR, Poitout V, Prentki M. Adipose triglyceride

- lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *J Biol Chem.* 2009; 284 (25): 16848-59.
29. Freeman H, Shimomura K, Horner E, Cox RD, Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metab.* 2006; 3 (1): 35-45.
 30. Fex M, Nitert MD, Wierup N, Sundler F, Ling C, Mulder H. Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia.* 2007; 50 (1): 74-83.
 31. Kennedy ED, Rizzuto R, Theler JM, Pralong WF, Bastianutto C, Pozzan T, Wollheim CB. Glucose-stimulated insulin secretion correlates with changes in mitochondrial and cytosolic Ca²⁺ in aequorin-expressing INS-1 cells. *J Clin Invest.* 1996; 98 (11): 2524-38.
 32. Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia.* 2005; 48 (2): 282-9.
 33. Mulder H, Ling C. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. *Mol Cell Endocrinol.* 2009; 297 (1-2): 34-40.
 34. Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *Eur J Biochem.* 1997; 246 (2): 259-73.
 35. Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *Eur J Biochem.* 1989; 186 (1-2): 129-36.
 36. da Silva Xavier G, Leclerc I, Varadi A, Tsuboi T, Moule SK, Rutter GA. Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *Biochem J.* 2003; 371 (Pt 3): 761-74.
 37. Lamontagne J, Pepin E, Peyot ML, Joly E, Ruderman NB, Poitout V, Madiraju SR, Nolan CJ, Prentki M. Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations. *Endocrinology.* 2009; 150 (8): 3465-74.

38. Wollheim CB. Beta-cell mitochondria in the regulation of insulin secretion: a new culprit in type II diabetes. *Diabetologia*. 2000; 43 (3): 265-77.
39. Tripathy D, Chavez AO. Defects in insulin secretion and action in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Curr Diab Rep*. 2010; 10 (3): 184-91.
40. Wikstrom JD, Katzman SM, Mohamed H, Twig G, Graf SA, Heart E, Molina AJ, Corkey BE, de Vargas LM, Danial NN, Collins S, Shirihai OS. beta-Cell mitochondria exhibit membrane potential heterogeneity that can be altered by stimulatory or toxic fuel levels. *Diabetes*. 2007; 56 (10): 2569-78.
41. Flamment M, Rieusset J, Vidal H, Simard G, Malthiery Y, Fromenty B, Ducluzeau PH. Regulation of hepatic mitochondrial metabolism in response to a high fat diet: a longitudinal study in rats. *J Physiol Biochem*. 2012; 68 (3): 335-44.
42. Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med*. 2004; 350 (7): 664-71.
43. Pi J, Collins S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cell function. *Diabetes Obes Metab*. 2010; 12 Suppl 2: 141-8.
44. Affourtit C, Jastroch M, Brand MD. Uncoupling protein-2 attenuates glucose-stimulated insulin secretion in INS-1E insulinoma cells by lowering mitochondrial reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med*. 2011; 50 (5): 609-16.
45. Lee SC, Robson-Doucette CA, Wheeler MB. Uncoupling protein 2 regulates reactive oxygen species formation in islets and influences susceptibility to diabetogenic action of streptozotocin. *J Endocrinol*. 2009; 203 (1): 33-43.
46. Pi J, Bai Y, Daniel KW, Liu D, Lyght O, Edelstein D, Brownlee M, Corkey BE, Collins S. Persistent oxidative stress due to absence of uncoupling protein 2 associated with impaired pancreatic beta-cell function. *Endocrinology*. 2009; 150 (7): 3040-8.
47. Sanders MJ, Grondin PO, Hegarty BD, Snowden MA, Carling D. Investigating the mechanism for AMP activation of the AMP-activated protein kinase cascade. *Biochem J*. 2007; 403 (1): 139-48.

48. Sato R, Goldstein JL, Brown MS. Replacement of serine-871 of hamster 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase prevents phosphorylation by AMP-activated kinase and blocks inhibition of sterol synthesis induced by ATP depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90 (20): 9261-5.
49. Leclerc I, Woltersdorf WW, da Silva Xavier G, Rowe RL, Cross SE, Korbitt GS, Rajotte RV, Smith R, Rutter GA. Metformin, but not leptin, regulates AMP-activated protein kinase in pancreatic islets: impact on glucose-stimulated insulin secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004; 286 (6): E1023-31.
50. Fu A, Ng AC, Depatie C, Wijesekara N, He Y, Wang GS, Bardeesy N, Scott FW, Touyz RM, Wheeler MB, Sreton RA. Loss of *Lkb1* in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. *Cell Metab*. 2009; 10 (4): 285-95.
51. Wojtaszewski JF, Mourtzakis M, Hillig T, Saltin B, Pilegaard H. Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002; 298 (3): 309-16.
52. Thomson DM, Brown JD, Fillmore N, Condon BM, Kim HJ, Barrow JR, Winder WW. LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism*. 2007; 293 (6): E1572-9.
53. Castermans D, Somers I, Kriel J, Louwet W, Wera S, Versele M, Janssens V, Thevelein JM. Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Res*. 2012; 22 (6): 1058-77.
54. Kowluru A, Chen HQ, Modrick LM, Stefanelli C. Activation of acetyl-CoA carboxylase by a glutamate- and magnesium-sensitive protein phosphatase in the islet beta-cell. *Diabetes*. 2001; 50 (7): 1580-7.
55. Peyton KJ, Liu XM, Yu Y, Yates B, Durante W. Activation of AMP-Activated Protein Kinase Inhibits the Proliferation of Human Endothelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012.
56. Gallagher EJ, LeRoith D. Diabetes, cancer, and metformin: connections of metabolism and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci*. 2011; 1243: 54-68.
57. Fu A, Eberhard C, Sreton RA. Role of AMPK in pancreatic beta cell function. *Molecular and cellular endocrinology*. 2012; July 3, published ahead of print.

58. Prentki M, Madiraju SR. Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocr Rev.* 2008; 29 (6): 647-76.
59. Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M. Hormone-sensitive lipase has a role in lipid signaling for insulin secretion but is nonessential for the incretin action of glucagon-like peptide 1. *Diabetes.* 2004; 53 (7): 1733-42.
60. Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V, Prentki M. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes.* 2004; 53 (4): 1007-19.
61. Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ. Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metab.* 2007; 6 (4): 320-8.

Figure legend:

Figure 1: Mitochondrial function is not altered in DIO islets. (A) $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ measured by Rhodamine123 fluorescence intensity in dispersed islets from ND, LDR and HDR mice. $\Delta\Psi_{\text{mito}}$ was initially measured at 3 mM glucose to set a baseline (not shown). Membrane polarization was then induced by incubation at 16 mM glucose. Complete depolarization was induced using 25 μM FCCP to confirm cell responsiveness. Data were normalized to the baseline fluorescence level. Represented on graph is the mean of 6 (ND) or 5 (LDR and HDR) mice. SEM is 0.004 for ND and LDR, and 0.006 for HDR. *** $p < 0.0001$ vs ND. One-way Anova, repeated measures, Tukey post-hoc test. (B) Mitochondrial O_2 consumption measured with the XF24 respiratory machine. Baseline O_2 consumption was established by incubating the islets at 3 mM glucose. Glucose-induced respiration was measured after islet stimulation at 16 mM glucose (16G). Depicted on graph are measurements after a steady-state was reached. Graph represents the mean \pm SEM of 7 (ND) or 8 (LDR and HDR) mice. —: ND; ◆: LDR; ○: HDR.

Figure 2: Dissociation of AMPK activity from ACC and HMG-CoA reductase activities in the DIO islets. (A-D) Total protein level of AMPK signaling pathway members. Proteins from non-treated isolated islets were resolved by SDS-PAGE and membranes were probed with antibody against T-ACC (A), T-SIRT1 (B), T-LKB1 (C) and T-AMPK α (D). Tubulin was used for normalization. Graph represents the mean \pm SEM of $n = \text{ND}$ (6-26), LDR (11-26), HDR (7-22). * $p < 0.05$ vs ND, ANOVA. (E-H) Glucose modulation of the AMPK signaling pathway. Proteins from islets treated at 3 mM or 16 mM glucose for 30 min were resolved by SDS-PAGE and membranes were probed with antibody against P-Thr¹⁷² AMPK α (E and F), P-Ser⁷⁹ ACC (G) and P-Ser⁸⁷² HMG-CoA reductase (H). Tubulin (E, G and H) or T-AMPK α (F) were used for normalization. Data are expressed as % of ND 3G. Graph represents the mean \pm SEM of $n = \text{ND}$ (7-13), LDR (9-19), HDR (6-8). ND group was not considered for statistical analysis. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs 3G for the same islet group, ANOVA; # $p < 0.05$ vs LDR, t-Test; \$ $p < 0.05$ for

HDR vs LDR of the same glucose concentration, ANOVA. ND: white; LDR: gray; HDR: black.

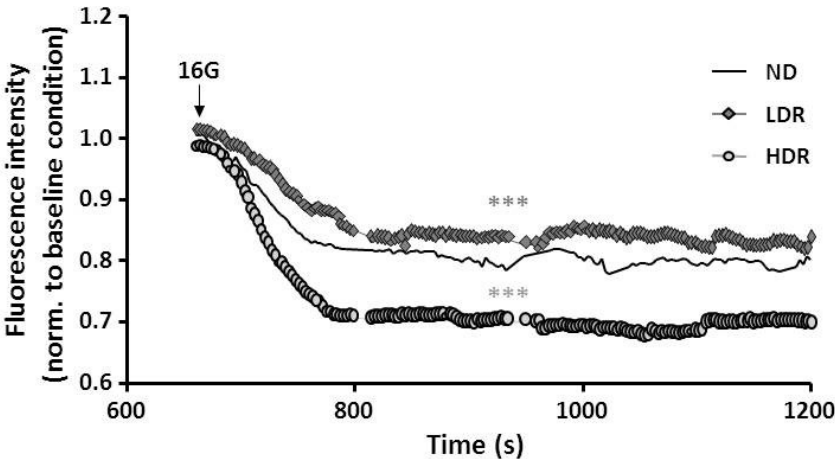
Figure 3: Increased PKC ϵ level in DIO islets. Proteins from non-treated isolated islets were resolved by SDS-PAGE and membranes were probed with antibody against T-PKC ϵ . Tubulin was used for normalization. n = ND (8), LDR (13), HDR (10). ND group was not considered for statistical analysis.

Figure 4: Model depicting the possible mechanisms responsible for the decreased GSIS observed as hyperglycemia develops in the DIO mouse model. Development of hyperglycemia in the DIO mouse model is characterized early on (both observed in LDR and HDR islets) by an increase in PKC ϵ protein which, with the elevated FA acid levels, might contribute to the increase activity of the pathway associated with decreased lipolysis and reduced insulin secretion. AMPK signaling pathway is also reduced, particularly at low glucose, and this may contribute to the activation of HMGCR (observed only in HDR islets) and the accumulation of intracellular cholesterol. Notably, cholesterol accumulation has been associated with reduced insulin secretion by the pancreatic β -cell. Additionally, glucose induced rise in ATP is reduced in both LDR and HDR islets, an effect that may be due to mild uncoupling, or reduced ATP synthase activity. Enhanced fat oxidation may lead to a buildup of reducing equivalent in the mitochondrion, mitochondrial hyperpolarization and exaggerated ROS production that could inhibit insulin secretion. Dotted lines show hypothetical mechanism. Dashed lines show indirect consequences. Green arrows indicate an increase while red arrows indicate a decrease.

Figures:

Figure 1

A



B

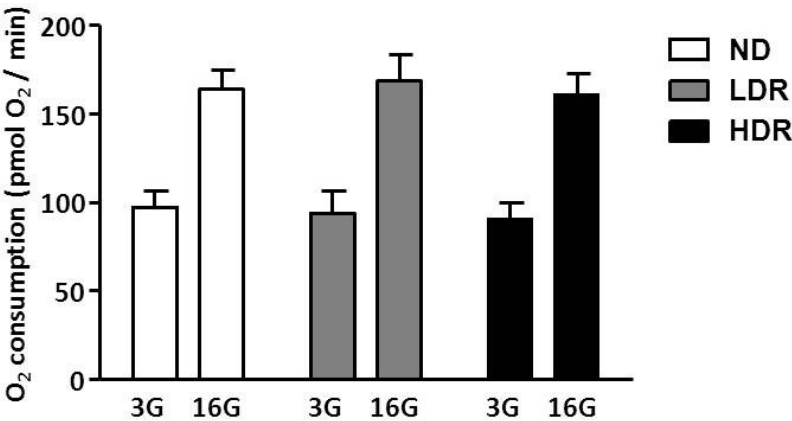


Figure 2

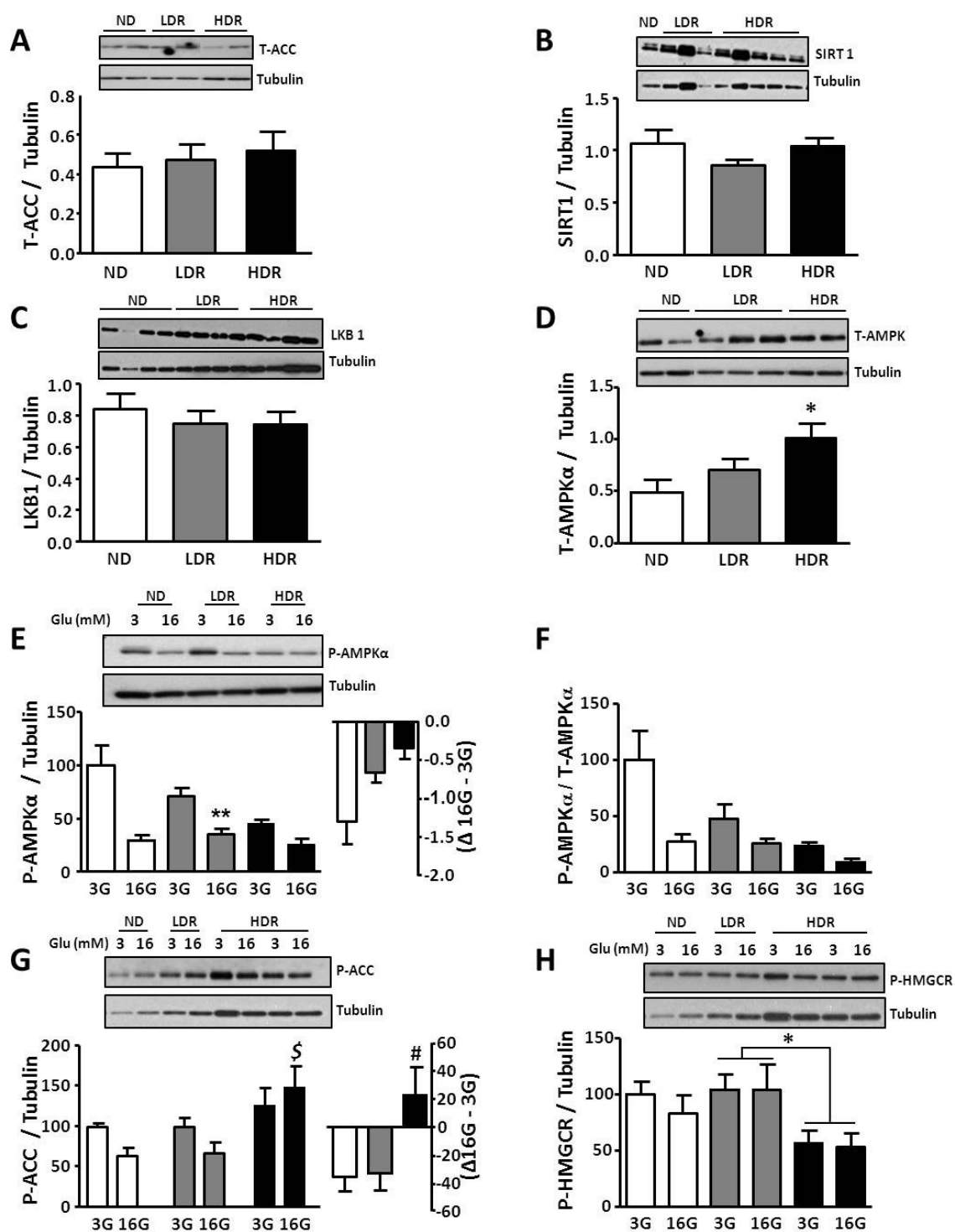


Figure 3

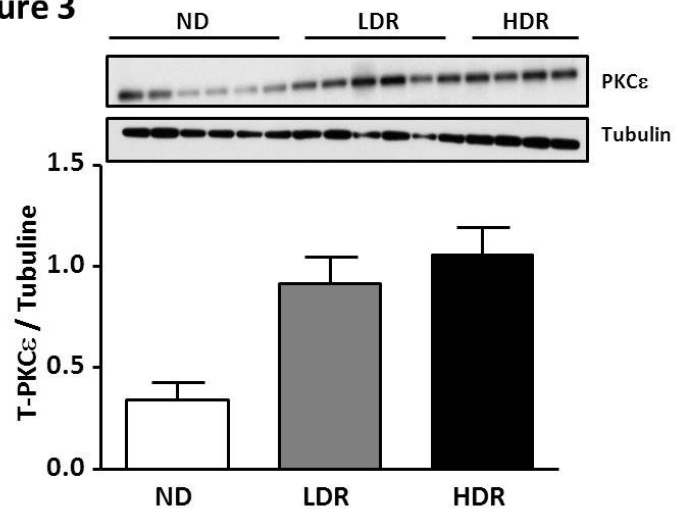
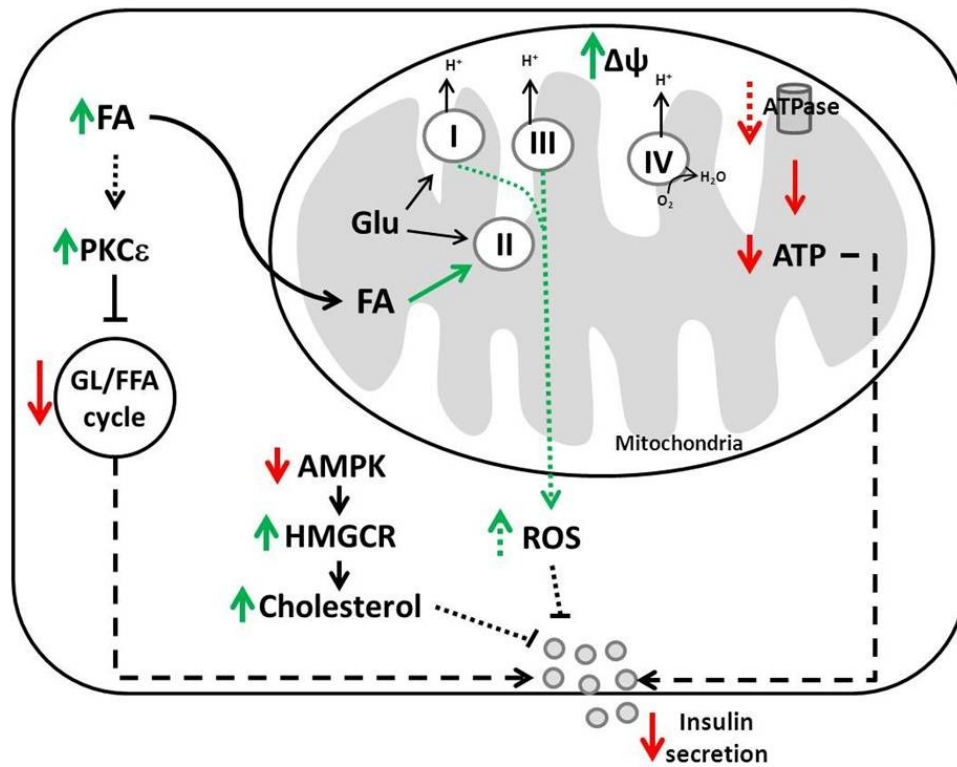


Figure 4



Chapitre 7. Discussion

La cellule β pancréatique sécrète l'insuline en réponse au glucose, aux acides gras et aux acides aminés. Au cours des dernières années, notre laboratoire a publié plusieurs études montrant que les acides gras ont la capacité de potentialiser la sécrétion d'insuline induite par le glucose *via* leur métabolisme, particulièrement *via* le cycle TG/FA (Peyot *et al*, 2004; Nolan *et al*, 2006; Peyot *et al*, 2009). Les acides gras potentialisent aussi la sécrétion d'insuline *via* le récepteur membranaire GPR40 (Latour *et al*, 2007). Par contre, peu d'études ont tenté d'identifier l'implication du métabolisme des acides gras dans la régulation négative de la sécrétion d'insuline. Ces mécanismes de régulation négative pourraient remplir différents rôles dans une situation physiologique normale ou physiopathologique. En situation normale, ces mécanismes permettent un ajustement rapide de la sécrétion d'insuline suite à l'ingestion d'un repas en limitant par exemple la durée et l'amplitude de la sécrétion, afin de prévenir des épisodes d'hyperinsulinémie et ainsi assurer le maintien d'une glycémie normale. En effet, l'hypersecretion de l'insuline pourrait entraîner des épisodes d'hypoglycémie très dommageables entre autres pour le cerveau dont le nutriment principal est le glucose sanguin. Dans un contexte physiopathologique tel le pré-diabète lié à l'obésité, l'abondance de nutriments dont les acides gras donne lieu à une sur-stimulation de la cellule β . Les mécanismes de régulation négative de la sécrétion viendraient ainsi contrôler la sécrétion d'insuline et permettraient d'éviter l'épuisement de la cellule β .

Les travaux réalisés au cours de cette thèse de doctorat ont mis en lumière des voies métaboliques, impliquées dans le métabolisme des acides gras, ayant un rôle inhibiteur de la sécrétion d'insuline dans un contexte normal ou pathologique. Tout d'abord, la protéine SCHAD, une enzyme impliquée dans l'oxydation des acides gras, assure une régulation négative de la sécrétion d'insuline grâce à sa double fonction comme enzyme impliquée dans l'oxydation des acides gras à chaîne courte et enzyme régulatrice de l'activité de la GDH. Ceci sera discuté en profondeur à la prochaine section. Ensuite, l'augmentation de l'expression de PKC ϵ et la diminution d'activité de la voie AMPK pourraient contribuer à la diminution de la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG) dans les îlots de souris

DIO en altérant le métabolisme des lipides, mécanismes pouvant être bénéfiques pour la cellule β et contribuer à sa survie.

7.1 SCHAD, une protéine assurant une régulation négative de la sécrétion d'insuline: mécanisme potentiellement impliqué

Jusqu'à maintenant, cinq cas de mutations inactivatrices de SCHAD chez l'humain ont été rapportés. Ces patients souffrent d'hyperinsulinémie et d'hypoglycémie, et présentent une accumulation de deux métabolites particuliers : le 3-hydroxybutyryl-carnitine dans le sang, et le 3-hydroxyglutarate dans l'urine. Dans une première étude, nous avons tenté d'identifier le/les mécanismes par lesquels SCHAD régule négativement la sécrétion d'insuline.

Pour réaliser cette étude, nous avons utilisé les outils de biologie moléculaire que sont les ARN interférants (RNAi). Plus particulièrement, nous avons utilisé deux formes de RNAi : les shRNA, qui sont produits par un vecteur d'ADN transfecté dans la cellule, et les siRNA, qui sont des duplexes d'ARN interférants transfectés directement dans la cellule. Lorsque nous avons débuté cette étude, la technologie de RNAi était alors relativement nouvelle et peu de compagnies avaient commercialisé des siRNA ou shRNA fonctionnels. Nous avons donc dû établir nous-même la séquence de ces RNAi dirigés contre SCHAD et des RNAi témoins (séquence aléatoire). Nous avons utilisé la méthode d'électroporation 'Nucleofector' afin de transfecter nos cellules avec nos constructions shRNA et siRNA. Cette méthode de transfection avait été nouvellement implantée dans le laboratoire et nous permettait d'atteindre une efficacité de transfection de plus de 80% pour la lignée cellulaire INS832/13.

Comme attendu, une diminution d'expression de SCHAD d'environ 80% par siRNA ou shRNA a augmenté la sécrétion d'insuline induite par le glucose (SIIG) mimant ainsi l'effet retrouvé chez les patients atteints par une mutation de SCHAD. Par contre, cette augmentation n'était pas modulée par l'effet potentialisateur des acides gras. La

diminution de l'expression de SCHAD a aussi augmenté la sécrétion d'insuline induite par les acides aminés (leucine et glutamine). Cette diminution d'expression n'a pas diminué l'oxydation des acides gras à chaîne longue ou moyenne, soit le palmitate ou l'octanoate. De plus, les résultats de sécrétion d'insuline en réponse à un traitement à la L-carnitine suggèrent que des molécules d'acyl-carnitine à chaîne courte et moyenne s'accumulent en absence de SCHAD et contribuent à l'hyperinsulinémie. Enfin, nous avons démontré que la transamination de l' α -KG ou de l'alanine est une réaction importante du mécanisme par lequel SCHAD régule négativement la sécrétion d'insuline. Ces résultats nous ont permis de suggérer un mécanisme par lequel l'absence de SCHAD stimule la sécrétion d'insuline de deux façons (Figure 15). En absence de SCHAD, des molécules d'acyl-carnitine à chaîne courte ou moyenne s'accumuleraient et agiraient comme sécrétagogues en potentialisant la sécrétion d'insuline d'une manière encore inconnue (voir flèches vertes). De plus, les dérivés CoA de ces molécules inhiberaient l'activité de l' α KGD, ce qui permettrait une accumulation d' α KG pour des voies de transamination liées à la SIIG en plus de prévenir une augmentation exagérée du flux du cycle de Krebs et de production de GTP à haut glucose au niveau de la SCS. Le GTP n'augmentant peu ou pas, ceci permettrait une activité maintenue de la GDH, permettant la déamination oxydative du glutamate en α KG, une voie connue pour potentialiser la sécrétion d'insuline par la glutamine, particulièrement en présence de leucine qui active la GDH (voir flèches fushia) (Pepin *et al*, 2010). De plus ceci permettrait le maintien du flux de la transamination par la retransformation du glutamate généré en α KG. Il est à noter que cette hypothèse pour expliquer nos résultats est basée sur l'observation que les dérivés du CoA à courte chaîne sont capables d'inhiber la α KGDH *in vitro* (Lai et Cooper, 1991).

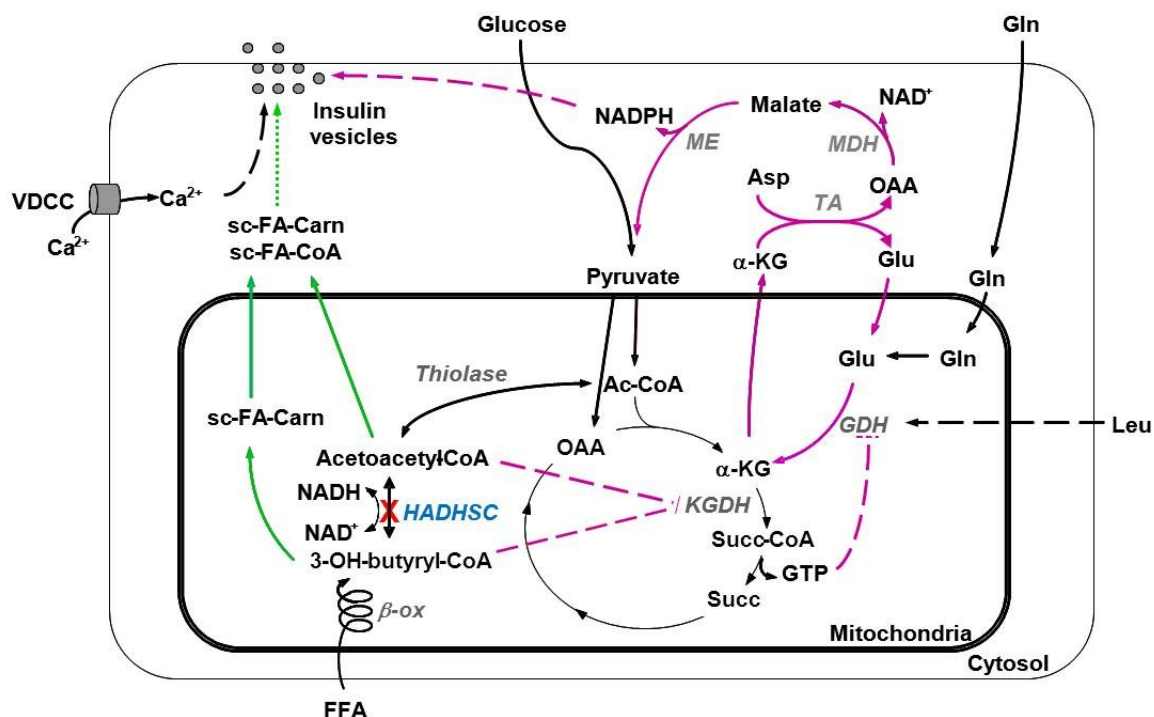


Figure 15. Mécanismes possibles de sécrétion d'insuline accrue en absence de SCHAD

En fushia : En absence de SCHAD (HADHSC) l'accumulation d'acyl-CoA à chaînes courtes viendrait inhiber l'enzyme α -cétoglutarate déshydrogénase (KGDH), entraînant une diminution du flux du cycle de Krebs et une diminution de la production de GTP. Le GTP étant un inhibiteur de l'enzyme glutamate déshydrogénase (GDH), la diminution des niveaux de GTP permettrait une augmentation de l'activité de la GDH, entraînant un métabolisme du glutamate accru, permettant l'augmentation de la sécrétion d'insuline. Parallèlement à ce mécanisme (en vert), les acyl-carnitines à courtes chaînes pourraient stimuler la relâche des granules d'insuline par un mécanisme encore mal défini. α KG : α -cétoglutarate; Asp : aspartate; Gln : glutamine; Glu : glutamate; Leu : leucine; OAA : oxaloacétate; sc-FA-Carn : acyl-carnitine à chaîne courte; sc-FA-CoA : acyl-CoA à chaîne courte; Succ : succinate; Succ-CoA : succinyl-CoA.

7.2 SCHAD, une protéine multifonctionnelle qui contrôlant l'activité de GDH

En parallèle avec notre étude, les publications de quatre autres laboratoires ont contribué à l'élaboration d'un mécanisme par lequel la diminution d'expression de SCHAD augmente la sécrétion d'insuline. Deux articles portent sur des études de diminution d'expression de SCHAD par siRNA ou shRNA en lignées cellulaires similaires à notre étude, alors que deux autres décrivent un modèle *in vivo* de délétion ubiquitaire de SCHAD. Il est à noter qu'aucun article dans le domaine n'avait été publié au moment où ce travail de thèse a commencé.

Tout d'abord, les études avec des lignées cellulaires démontrent que l'hypersécrétion causée par la diminution d'expression de l'ARNm de SCHAD survient suite à une stimulation au glucose (*Martens et al, 2007; Pepin et al, 2010*) et aux acides aminés (*Pepin et al, 2010*). SCHAD semble aussi accentuer la sécrétion basale d'insuline (*Hardy et al, 2007; Martens et al, 2007*), ce que nous n'avons pas observé dans notre étude. Ces résultats sont en accord avec l'hyperinsulinémie chronique, plus accentuée de façon postprandiale, des patients porteurs d'une mutation de SCHAD répertoriés dans la littérature. De plus, le groupe de *Martens et al, 2007* a observé une diminution d'environ 25% de l'oxydation du palmitate, un acide gras à chaîne longue, alors que nous et une autre étude n'avons observé aucun changement (*Hardy et al, 2007; Pepin et al, 2010*). Le niveau d'expression en ARNm de SCHAD étant très largement supérieur aux autres enzymes de la β -oxydation, cette divergence dans les résultats peut être expliquée par les niveaux d'expression résiduelle variables de SCHAD obtenus suite au traitement aux divers RNAi. D'ailleurs, les études chez les patients porteurs de mutations démontrent que le phénotype observé est dépendant du degré d'inhibition de l'activité de SCHAD.

Par la suite, les laboratoires de Schulz et Li ont généré et caractérisé des souris porteuses d'une inactivation ubiquitaire du gène HADHSC (SCHAD $-/-$). Ces souris ont des phénotypes très distincts. En effet, alors que Schulz *et al, 2011* ont observé une

augmentation de la SIIG dans les îlots SCHAD -/- venant confirmer nos résultats, Li *et al*, 2010 ont observé une SIIG normale alors que l'exposition d'îlots à des concentrations élevées d'acides aminés augmente de façon importante la sécrétion d'insuline comparativement aux îlots de souris sauvage. La sécrétion en réponse aux acides aminés n'a pas été testée dans le modèle de Schulz. La différence de phénotype pourrait être causée par la différence dans le fond génétique des lignées de souris, la souris de Schulz étant une C57BL/6 purifié par rétrocroisement sur 6 à 10 générations, alors que la souris de Li possède un génotype mélangé de C57BL/6 et NIH Black Swiss sans rétrocroisement rapporté. Par ailleurs, les deux modèles *in vivo*, tout comme l'étude *in vitro* de Martens *et al* et les études cliniques de patients, démontrent l'accumulation d'hydroxyacyl à chaîne courte ou leurs dérivés carnitine dans le sang, l'urine ou même les tissus, indicateur d'une diminution de la fonction oxydative de SCHAD (Martens *et al*, 2007; Li *et al*, 2010; Schulz *et al*, 2011). Ceci est appuyé par des mesures de calorimétrie indirecte par Schulz *et al*, 2011 qui démontrent que l'oxydation des acides gras est diminuée en absence de SCHAD, menant à l'accumulation d'espèces lipidiques à chaîne courtes. Enfin, des études d'interactions protéiques ont révélé que la protéine SCHAD se lie à l'enzyme GDH et diminue son efficacité envers son substrat, le glutamate (Figure 16) (Filling *et al*, 2008). Ainsi, en absence de SCHAD, l'activité de GDH est accrue, augmentant l'oxydation du glutamate et la sécrétion d'insuline, tout au moins par la glutamine. Le phénotype en absence de SCHAD s'apparente donc à celui des patients porteurs de mutations activatrices de GDH connues pour causer le syndrome d'hyperinsulinémie/hyperammonémie. La liaison de SCHAD à GDH n'affecte cependant pas la capacité du GTP à inhiber cette-dernière (Li *et al*, 2010). SCHAD est donc une protéine multifonctionnelle dans la mesure où SCHAD peut à la fois catalyser l'oxydation des acides gras à chaîne courte et probablement régule l'activité de l'enzyme GDH (Figure 16).

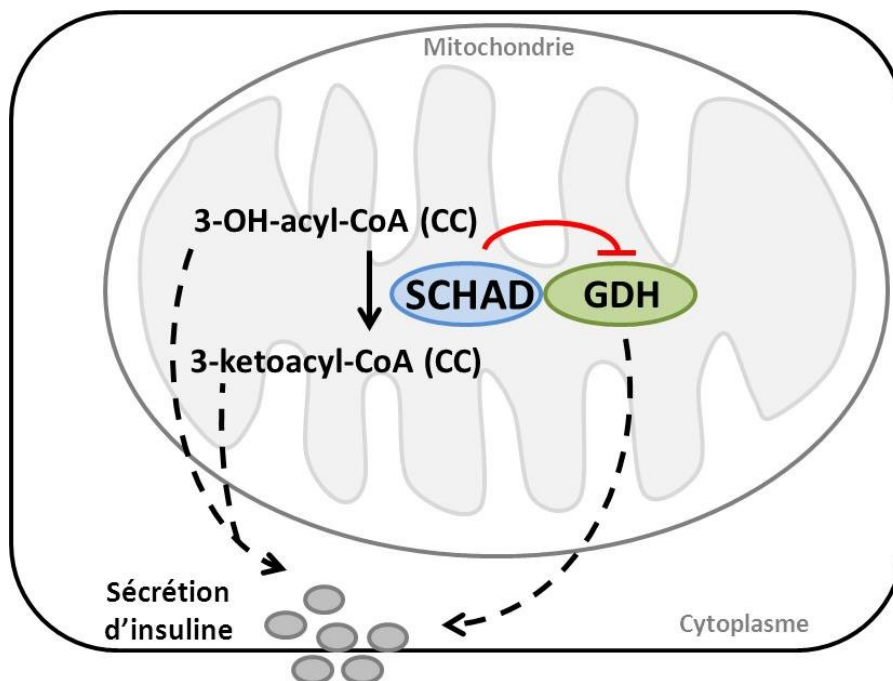


Figure 16. La multifonctionnalité de SCHAD

L'enzyme SCHAD catalyse la 3^e étape de la β -oxydation des acides gras à chaîne courte. De plus, grâce à une interaction protéine-protéine, SCHAD régule négativement l'activité de GDH. Ainsi, chez les humains porteurs d'une mutation inactivatrice de SCHAD, l'activité de GDH se trouve augmentée ce qui contribue à l'hyperinsulinémie, en plus des molécules d'acyl-CoA et carnitine à chaîne courte qui s'accumulent et qui pourraient contribuer à l'augmentation de la sécrétion d'insuline.

La démonstration par Li *et al*, 2010 de la régulation de GDH par SCHAD vient confirmer une partie de notre hypothèse selon laquelle l'inhibition de α KGDH par des acyl-CoA à chaîne courte favorise l'export de l' α -KG, qui par transamination produit du glutamate, le substrat de GDH, qui, ayant une activité accrue, contribuera à augmenter la sécrétion d'insuline (Pepin *et al*, 2010). Une récente publication affirme que SCHAD inhibe la sécrétion d'insuline uniquement grâce à sa capacité à réguler allostériquement GDH (Martins *et al*, 2011). Nous ne partageons pas ce point de vue. Martins *et al*

démontrent que le nombre de molécules d'ARNm et l'activité de SCHAD seraient respectivement cinq et sept fois plus élevés que ceux de GDH dans une cellule normale (Martens *et al*, 2007). Ceci suggère que ce n'est pas l'ensemble des protéines SCHAD qui sont liées et impliquées dans la régulation de GDH. De plus, nos résultats ainsi que ceux de Martens *et al*, 2007 suggèrent que des acyl-carnitine, stimulateurs de la sécrétion d'insuline, sont produits de façon accrue lors d'une déficience en SCHAD. Le mode d'action de ces dérivés d'acide gras reste à être identifié, mais il se pourrait aussi que c'est par ce mécanisme que SCHAD contrôle la sécrétion d'insuline. Les évidences présentées jusqu'à maintenant suggèrent donc l'implication de ces deux fonctions de SCHAD dans la régulation de la sécrétion d'insuline, (modulation de GDH et production d'acyl-carnitine à courte chaîne) mais leur importance relative est encore mal comprise.

SCHAD est donc un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline induite par les acides aminés (glutamine plus leucine) en raison de son activité régulatrice de GDH. Les études avec des lignées cellulaires suggèrent que SCHAD serait aussi un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline induite par le glucose mais ceci n'a été confirmé que dans une des deux études *in vivo*. D'où vient cette différence? Tout d'abord, le degré d'inhibition de l'expression en ARNm de SCHAD ne dépassait pas les 80% dans les études *in vitro*. L'étude de Martens *et al*, 2011 et les rapports cliniques de patients porteurs de mutations de SCHAD ont montré que la sévérité de l'hyperinsulinémie dépend du degré d'activité résiduelle de l'enzyme (Bennett *et al*, 2006; Martens *et al*, 2007; Martins *et al*, 2011). De plus, alors qu'un seul des patients diagnostiqués n'a subi un test de tolérance à un repas riche en protéines (montrant la sensibilité aux acides aminés), aucun patient n'a subi d'hyperglycémie provoquée intraveineuse (IVGTT, *intravenous glucose tolerance test*). Ce test aurait pu nous informer sur leur sécrétion d'insuline en réponse au glucose, car l'IVGTT est le test de référence pour la mesure de la sécrétion d'insuline chez l'humain. Enfin, bien que le modèle murin soit un modèle *in vivo* plus informatif au point de vue physiologique que les modèles *in vitro*, des mesures de SIIG en îlots humains SCHAD +/- seraient nécessaires pour élucider le rôle de SCHAD dans la régulation de la SIIG.

7.3 L'importance de SCHAD dans la régulation de la sécrétion d'insuline par la cellule β

SCHAD est présent dans plusieurs tissus, mais son expression est particulièrement élevée dans la cellule β pancréatique relativement aux autres enzymes de la β -oxydation. Ceci suggère une fonction importante de SCHAD dans l'homéostasie métabolique de la cellule β . Les études de cas chez l'humain, chez les souris SCHAD $-/-$ et les études avec des lignées cellulaires montrent qu'en son absence, la sécrétion d'insuline est augmentée de 1.5 à 3 fois (*Clayton et al*, 2001; *Molven et al*, 2004; *Hussain et al*, 2005; *Hardy et al*, 2007; *Martens et al*, 2007; *Pepin et al*, 2010; *Martins et al*, 2011). L'action inhibitrice de SCHAD sur GDH permet un certain contrôle de la sécrétion d'insuline. GDH est une enzyme importante du métabolisme des acides aminés en catalysant l'oxydation du glutamate en α KG, et permettant ainsi l'entrée des carbones des acides aminés dans le cycle de Krebs ce qui contribue à la production d'ATP. La régulation adéquate de l'activité de la GDH semble importante pour la sécrétion d'insuline car une mutation activatrice de GDH entraîne une hypersécrétion d'insuline par la cellule β . Donc, de par son interaction avec GDH, SCHAD vient réguler négativement l'activité de GDH. Cependant, comme l'hyperinsulinémie liée à l'hyperactivation de GDH est caractérisée par une augmentation de plus de cinq fois de la sécrétion d'insuline par la cellule β et que l'absence de SCHAD est caractérisée par une hyperinsulinémie d'environ trois fois la normale, il semble que SCHAD ne soit pas la seule valve de sûreté contrôlant l'activité de GDH dans la cellule β (*Palladino et Stanley*, 2010). Ainsi les études récentes ainsi que notre thèse montrent que SCHAD est une enzyme au carrefour du métabolisme des acides gras et des acides aminés, et peut-être du métabolisme du glucose. Ce dernier point nécessite plus d'études.

Nous avons donc démontré qu'en plus de son activité oxydative des acides gras, SCHAD agit comme protéine de surveillance contre l'hypersécrétion en situation d'abondance de nutriments dans une cellule normale. Ceci pourrait constituer une défense

contre l'épuisement de la cellule β dans le développement du DT2 ou une défense contre l'obésité elle-même car l'hyperinsulinémie est liée à un gain de poids et au DT2. Il serait donc intéressant d'investiguer sa contribution à l'augmentation compensatoire de la sécrétion d'insuline en période pré-diabétique, mécanisme qui permet de pallier à l'augmentation de la résistance à l'insuline des tissus périphériques.

7.4 Le rôle de SCHAD dans le métabolisme d'autres tissus en situation non-pathologique

Le mécanisme par lequel SCHAD agit comme régulateur de la sécrétion d'insuline est maintenant mieux compris, cependant peu de choses sont encore connues sur l'importance de SCHAD dans d'autres tissus. Une diminution d'activité partielle de SCHAD décrite chez un patient a entraîné des symptômes similaires à une perte d'activité des autres enzymes de la β -oxydation, dont une hypoglycémie/hypocétonémie, une dysfonction hépatique et une encéphalopathie pouvant mener à l'apparition de convulsions (*Bennett et al*, 2006). Ceci indique que l'activité de SCHAD, comme attendu, est importante dans l'oxydation des acides gras de divers tissus. Par ailleurs, SCHAD étant un inhibiteur allostérique de GDH dans la cellule β , il occupe probablement la même fonction dans les tissus où ces deux enzymes sont exprimées. Cependant, l'hyperactivation de GDH dans le foie cause une hyperammoniémie qui n'est pas présente en absence de SCHAD, ce qui va à l'encontre d'une régulation de GDH par SCHAD dans cet organe (*Palladino et Stanley*, 2010). Enfin, l'étude de la souris SCHAD $-/-$ générée par Schulz *et al*, 2011 démontre que l'absence de l'enzyme cause une susceptibilité au froid dû à une incapacité du tissu adipeux brun à oxyder les acides gras à un rythme accéléré pour maintenir la température corporelle adéquate. Ces expériences suggèrent une contribution importante de la β -oxydation et de SCHAD dans l'homéostasie lipidique et thermique du corps.

7.5 L'implication de SCHAD dans le développement du DT2

En plus de son rôle dans la régulation de la sécrétion d'insuline, SCHAD pourrait être impliqué dans l'induction de la résistance à l'insuline du muscle squelettique. En effet, le laboratoire du Dr Muoio (*Koves et al*, 2008; *Bell et al*, 2010) a suggéré que la résistance à l'insuline du muscle de souris soumises à une diète riche en gras ou chez des femmes sévèrement obèses (BMI=48), pourrait être due, au moins en partie, à une augmentation de l'oxydation incomplète des acides gras, entraînant l'accumulation d'acyl-CoA et d'acyl-carnitine à chaîne moyenne et courte. Le mécanisme par lequel ces dérivés d'acides gras contribuent au développement de la résistance à l'insuline n'est pas encore connu, mais leur accumulation pourrait causer une acylation anormale de certaines protéines mitochondriales ou cytoplasmiques, et ainsi modifier le métabolisme intracellulaire (*Koves et al*, 2008). L'accumulation d'acyl-CoA ou -carnitine à chaîne moyenne et courte a été démontrée suite à une réduction d'activité de SCHAD (*Martens et al*, 2007). Il serait donc pertinent d'évaluer l'activité de cette enzyme dans le muscle de patients obèses diabétiques, et ainsi de savoir si une diminution d'activité de SCHAD induite par une dyslipidémie contribue à la résistance à l'insuline du muscle.

D'autre part, les études *in vitro* et *in vivo*, en plus des rapports cliniques de mutations chez l'homme, démontrent l'importance de SCHAD dans la régulation de la sécrétion d'insuline d'une cellule normale. Cependant, est-ce qu'un dérèglement de cette régulation pourrait participer au développement du DT2? Le ZF est un modèle génétique d'obésité et de compensation de la cellule β pancréatique. Les rats ZF sont résistants à l'insuline mais compensent cette résistance par une augmentation de la sécrétion d'insuline associée à l'augmentation du métabolisme des lipides par le cycle TG/FFA, et ne développent donc pas le DT2 (*Nolan et al*, 2006). Les rats ZF sont donc hyperinsulinémiques en comparaison aux rats témoins *Zucker Lean*. Nous avons observé que cette hyperinsulinémie corrèle avec une diminution de 40% de l'expression en ARNm de SCHAD (*Pepin et al*, 2010). Nous émettons l'hypothèse que l'hyperinsulinémie chez les rats ZF obèses, normoglycémiques et insulino-résistants, pourrait être due à l'augmentation

d'acyl-CoA ou acyl-carnitine de même qu'à une augmentation de l'activité de l'enzyme GDH. Cependant, l'activité de GDH et les niveaux d'intermédiaires carnitine à chaîne moyenne ou courte n'ont jamais été mesurés dans les îlots ZF. L'étude de ce modèle suggère donc qu'une altération de la régulation de la sécrétion par SCHAD pourrait contribuer à la compensation de la cellule β dans une situation de pré-diabète.

Nous avons aussi testé l'implication de SCHAD dans un autre modèle d'obésité induit par la diète, la souris DIO où on observe une hyperinsulinémie. Cependant, les niveaux d'expression d'ARNm de SCHAD ne sont pas changés dans ce modèle (Figure 17), ce qui suggère que d'autres mécanismes sont impliqués dans l'hypersecrétion chez la souris DIO.

En résumé, SCHAD est un régulateur négatif de la sécrétion d'insuline en situation normale, mais ne semble pas nécessairement être impliqué dans la dysfonction de la cellule β . D'autres voies de régulation négative de la sécrétion d'insuline devraient exister dans la cellule β et pourraient être activées de façon différente entre un sujet sain, hyperinsulinémique ou pré-diabétique ayant une dysfonction de la cellule β . Nous avons donc entrepris d'identifier ces voies complémentaires dans le modèle d'hyperglycémie liée à l'obésité dans les îlots de la souris DIO.

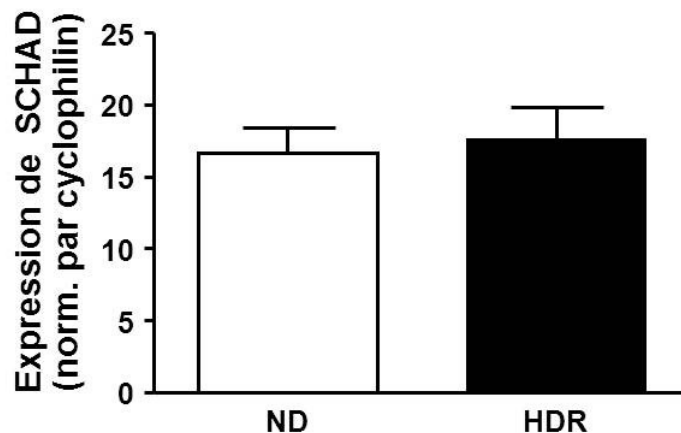


Figure 17. Expression des niveaux d'ARNm de SCHAD dans les îlots de souris DIO-HDR

L'expression de SCHAD n'est pas modulée par l'administration d'une diète riche en gras durant 8 semaines. Expression mesurée par PCR en temps réel (*Pepin*, résultats non publiés).

7.6 La dysfonction de la cellule β chez la souris DIO

Nous avons étudié le modèle de la souris DIO soumise à une diète riche en gras pendant 8 semaines. Nous avons observé une hétérogénéité dans la prise alimentaire des souris C57BL/6 nourries à la diète riche en gras, hétérogénéité que nous n'avons pas observée chez les souris témoins nourries avec la diète normale (ND). L'originalité de notre étude réside dans la stratification des souris DIO en faibles (LDR, *low diet responder*) et forts (HDR, *high diet responder*) répondants à la diète en fonction de leur masse corporelle suite aux 8 semaines de diète de même qu'à l'utilisation de souris mâles. Les études précédentes de ce modèle avaient été réalisées principalement chez la souris femelle, qui est moins sensible au développement du diabète probablement en raison de la présence accrue de l'hormone estrogène qui a un rôle anti-lipogénique et protecteur pour la cellule β (*Tiano et al*, 2011).

La souris LDR démontre une diminution de la sensibilité à l'insuline de 50% relativement à la souris ND, est intolérante au glucose mais semble compenser

adéquatement. En effet, la souris LDR a une hyperplasie des cellules β d'environ 30%, permettant *in vivo* une sécrétion presque adéquate d'insuline, et ce en dépit d'une diminution de la réponse au glucose ce qui cause l'apparition d'une hyperglycémie très légère. Par ailleurs, la souris HDR est résistante à l'insuline de façon plus accentuée que la souris LDR et est incapable de compenser adéquatement. La prolifération et la masse des cellules β est néanmoins augmentée d'environ 40% par rapport aux souris ND, ce qui n'est probablement pas suffisant malgré l'HI et entraîne une atténuation marquée de la capacité du glucose à induire la sécrétion. Les mécanismes responsables de cette HI sont encore mal compris. Certaines études ont rapporté une augmentation de la sécrétion basale suite à une diète riche en gras (Fex *et al*, 2007), ce que nous n'avons pas observé ni chez les LDR et ni chez les HDR. Cependant, l'étude par Fex *et al*, 2007 portait sur une cohorte de souris nourries pendant 12 semaines, ce qui pourrait suggérer que l'augmentation de la sécrétion basale est une altération qui arrive plus tardivement dans le développement de la dysfonction sécrétoire. Le mécanisme lié à cette dysfonction et sa contribution au développement de l'hyperglycémie a été le sujet d'étude de cette thèse.

7.7 Implication du métabolisme des acides gras sur la potentialisation de la sécrétion d'insuline des souris DIO LDR et HDR

Suite à la caractérisation métabolique *in vivo* des souris DIO, une différence majeure a été identifiée en ce qui a trait au métabolisme des acides gras dans les îlots de ces souris. Premièrement, la lipolyse, voie métabolique productrice de molécules signalétiques lipidiques, est diminuée à haut glucose dans les îlots LDR et HDR. Cette diminution pourrait expliquer en partie la diminution de sécrétion en réponse au glucose observée chez ces souris. Par contre, certains changements ne surviennent que dans les îlots HDR. En effet, alors que le métabolisme des acides gras par cycle TG/FFA est favorisé en présence de hautes concentrations de glucose dans les souris ND, ce cycle producteur de molécules

signalétiques lipidiques est inhibé chez les souris LDR et HDR, et les acides gras sont plus oxydés (voie métabolique négative de la sécrétion) seulement chez les souris HDR. De plus, nous avons mesuré spécifiquement dans les îlots HDR une augmentation des concentrations d'acides gras libres et de cholestérol libre. Ces changements métaboliques pourraient expliquer la dysfonction accentuée des îlots HDR en comparaison aux îlots LDR.

Tout d'abord, l'oxydation des acides gras est habituellement augmentée lorsque les concentrations de glucose baissent, par exemple entre les repas ou suite à un jeûne. La cellule β ayant comme nutriment préférentiel le glucose, l'augmentation de celui-ci suite à un repas entraîne l'inhibition de la β -oxydation et les acides gras sont alors estérifiés pour potentialiser la sécrétion. La β -oxydation est donc considérée comme un signal négatif pour la sécrétion d'insuline en situation normale. Par contre, en situation pathologique comme dans le modèle DIO, l'abondance chronique de nutriments tels le glucose et les acides gras entraîne l'accumulation de molécules lipidiques dans la cellule β comme nous le démontrent les niveaux élevés de NEFA dans les îlots HDR. Ces concentrations élevées d'acides gras peuvent avoir à long terme des conséquences néfastes dont la production de céramides, dérivés lipidiques causant l'apoptose des cellules β , ou la stimulation prolongée de la sécrétion d'insuline, qui peut mener à l'épuisement de la cellule (*Sako et Grill, 1990; Mason et al, 1999; Kelpé et al, 2003*). De plus, l'augmentation d'acyl-CoA à chaîne longue peut modifier l'activité de plusieurs protéines et ainsi affecter la sécrétion d'insuline (*Branstrom et al, 1997; Girard, 2005*). Ainsi, l'augmentation de l'oxydation des acides gras peut avoir deux conséquences bénéfiques principales. Premièrement, la diminution de la concentration d'acides gras intracellulaire peut prévenir la formation de céramides et assurer la survie de la cellule. Deuxièmement, l'oxydation des molécules lipidiques accumulées peut contribuer à atténuer les signaux potentialisateurs de la sécrétion d'insuline, pour prévenir l'essoufflement de la cellule, et préserver ses capacités sécrétoires.

Ensuite, la présence de cholestérol intracellulaire est essentielle aux fonctions sécrétoires de la cellule β . Par la consolidation de micro-domaines nommés radeaux

lipidiques, la présence de cholestérol dans la membrane plasmique assure le bon fonctionnement de plusieurs récepteurs et canaux ioniques (*Xia et al*, 2008). Par contre, une trop grande concentration de cholestérol peut aussi être nuisible aux fonctions d'exocytose, entre autres de par l'activation de nNos, qui inhibe la glucokinase, causant une diminution de la relâche des granules d'insuline (Figure 18). En effet, l'invalidation de la protéine ABCA1 (un transporteur assurant la sortie du cholestérol de la cellule) dans la cellule β entraîne l'augmentation des niveaux de cholestérol intracellulaire et induit une diminution de la sécrétion d'insuline (*Brunham et al*, 2007). En revanche, l'augmentation des niveaux de HDL circulants (une lipoprotéine assurant le rétro-transport du cholestérol vers le foie pour la formation d'acide biliaire) est associée à une amélioration de la sécrétion d'insuline (*Drew et al*, 2009) chez l'humain. Nous avons obtenu des évidences suggérant que l'augmentation des niveaux de cholestérol dans les îlots HDR pourrait être causée, entre autres, par une augmentation de l'activité de HMGCR, contribuant à la diminution de la sécrétion d'insuline (article 3). Il serait aussi intéressant de savoir si l'augmentation du cholestérol est liée à l'augmentation de sa captation par le récepteur aux LDL à la surface de la cellule ou une diminution de la protéine PCSK9 impliquée dans la dégradation du récepteur aux LDL (*Poirier et al*, 2008) ou à une diminution de son export par la protéine ABCA1. Nous pouvons par contre avancer l'hypothèse que l'augmentation très marquée (2 fois) des niveaux de cholestérol libre dans les îlots HDR contribue probablement à la diminution de sécrétion d'insuline observée et à la dysfonction de la cellule β chez les souris DIO-HDR. Ceci pourrait être testé directement dans des études futures.

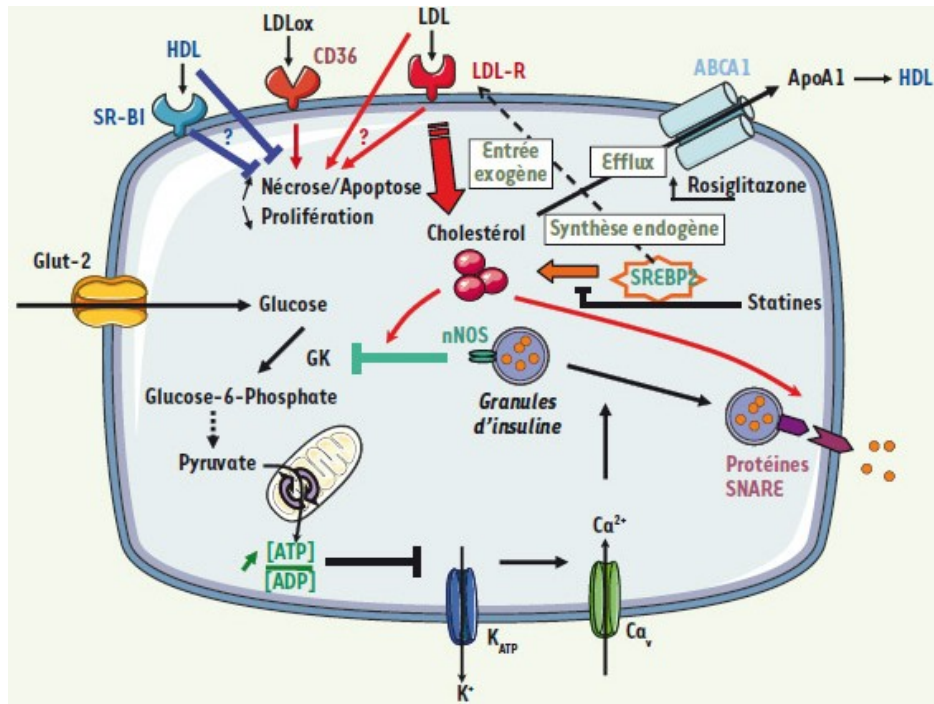


Figure 18 Métabolisme du cholestérol dans la cellule β pancréatique

Le contenu intracellulaire en cholestérol des cellules β pancréatiques est régulé par la synthèse endogène du cholestérol, l'entrée de cholestérol exogène ou son efflux. La synthèse du cholestérol est contrôlée par le facteur de transcription SREBP2 et l'étape limitante est catalysée par l'enzyme HMGCR. L'entrée du cholestérol dans la cellule β est possible via l'internalisation des LDL (low density lipoproteins) par le récepteur aux LDL (LDL-R). Enfin, l'efflux du cholestérol est dépendant de l'expression du transporteur ABCA1. Les variations du contenu en cholestérol influencent la sécrétion de l'insuline par la cellule β par des mécanismes encore incompris. L'augmentation du cholestérol intracellulaire peut ainsi favoriser la dimérisation de la nNOS, un inhibiteur de la glucokinase (GK). La cellule est alors moins sensible aux variations du glucose intracellulaire et la sécrétion d'insuline glucose-dépendante est diminuée. De façon alternative, le cholestérol intracellulaire influence la sécrétion d'insuline en agissant directement sur l'exocytose des granules en modifiant les microdomaines de la membrane et la redistribution des protéines SNARE nécessaires à l'attachement des granules à la membrane plasmique. (Image tirée de la revue Médecine/Science (*Langhi et Cariou*, 2010) avec la permission de l'éditeur).

7.8 Métabolisme mitochondrial de la cellule β et défaut de sécrétion d'insuline dans les souris DIO

La mitochondrie est le site d'intégration de tous les stimuli nutritionnels entre autres dans le but de synthétiser l'ATP. Les études de différents modèles animaux (*Kennedy et al*, 1996; *Freeman et al*, 2006; *Fex et al*, 2007) et d'îlots humains de patients diabétiques (*Anello et al*, 2005) ont suggéré qu'une dysfonction mitochondriale pourrait entraîner une réduction de la sécrétion d'insuline et le développement du DT2 (*Mulder et Ling*, 2009). Nous avons observé une diminution de l'augmentation des niveaux d'ATP en réponse au glucose et l'augmentation de l'expression d'UCP-2 chez les souris LDR et HDR (article 2). UCP-2 était jusqu'à récemment considéré comme une protéine découplante, et donc l'augmentation de son expression aurait pu expliquer la diminution de l'effet du glucose sur l'ATP des îlots de souris DIO. Cependant, de récentes publications semble indiquer que UCP-2 ne serait par une protéine découplante mais assurerait une régulation négative de la production des espèces réactives à l'oxygène (*reactive oxygen species*, ROS) (*Produit-Zengaffinen et al*, 2007; *Robson-Doucette et al*, 2011).

À quoi peut-on attribuer la diminution de l'effet du glucose sur les niveaux d'ATP des îlots DIO? La mesure du potentiel de membrane mitochondrial démontre que les membranes des mitochondries HDR sont hyperpolarisées en comparaison aux ND ou LDR (article 3). En présence d'un couplage adéquat et sans effet sur l'ATP synthase, ceci devrait se traduire en une augmentation de la respiration mitochondriale et de la synthèse d'ATP. Or, la respiration mitochondriale des îlots DIO induite par le glucose est inchangée par la diète et l'effet du glucose sur le contenu en ATP des îlots DIO est diminué (article 2 et 3). Nous proposons deux explications. Premièrement, il a été montré que l'accumulation d'acides gras dans le muscle squelettique et les hépatocytes est associée à une diminution importante de la synthèse d'ATP (*Petersen et al*, 2003; *Petersen et al*, 2004). Nous suggérons donc que l'élévation des concentrations de NEFA observée dans les îlots HDR pourrait entraîner une diminution de l'activité de l'ATP synthétase, contribuant à l'accumulation de protons dans l'espace inter-membranaire et à la diminution de la

synthèse d'ATP en réponse au glucose. Deuxièmement, la diminution de la synthèse d'ATP pourrait être liée à une altération légère de la chaîne respiratoire et une production de ROS, contribuant à la diminution de SIIG plus accentuée dans les îlots HDR que dans les îlots LDR. Ceci est compatible avec une consommation d'oxygène inchangée entre les groupes.

Le rôle des ROS dans l'homéostasie de la cellule β est encore très controversé, en particulier en ce qui a trait à la sécrétion d'insuline (*Pi et al*, 2007; *Saadeh et al*, 2012). Quoique les mécanismes d'action des ROS ne soient pas encore complètement élucidés, il semble que leur effet soit dépendant de leur abondance et de la durée d'exposition. Une élévation marquée et chronique des ROS, en condition de glucolipotoxicité par exemple (*El-Assaad et al*, 2010), peut être dommageable pour la cellule β car elle possède très peu de mécanismes antioxydants (*Newsholme et al*, 2007). Cependant, une élévation 'non-dommageable' des ROS est maintenant reconnue comme ayant un effet signalétique potentialisateur de la croissance cellulaire (*Burdon*, 1995), de l'activation de certaines kinases (*Lo et al*, 1996; *Pi et Collins*, 2010) et de l'expression de certains gènes (*Schoonbroodt et Piette*, 2000; *Finkel*, 2012). De plus, les études de *Pi et al*, 2007 dans les îlots de souris révèlent que la génération de ROS induite en présence de concentrations basses (3 mM) de glucose est bénéfique pour la sécrétion d'insuline basale. Par contre, en présence de concentrations élevées de glucose, l'augmentation de la production de ROS serait néfaste pour la sécrétion d'insuline (*Pi et al*, 2007). Enfin, les ROS sont produits par des mécanismes mitochondriaux (CTE) ou cytoplasmiques (NADPH oxydase) (*Newsholme et al*, 2007; *Finkel*, 2012). Il sera intéressant d'évaluer la contribution de chaque mécanisme à la bonification ou l'inhibition de la sécrétion d'insuline. L'implication des ROS dans la régulation de la sécrétion d'insuline est encore mal connue et méritera une attention particulière pour les recherches futures.

7.9 AMPK et sécrétion d'insuline dans la pathologie du DT2 lié à l'obésité

La protéine AMPK est un senseur énergétique clé de la cellule. Elle assure une balance entre les voies productrices et consommatrices d'énergie en fonction de la disponibilité des nutriments. Elle agit comme commutateur du métabolisme des acides gras dans la cellule β par la régulation de la production du malonyl-CoA (Figure 14) et est impliquée dans la régulation de la biogénèse des mitochondries, de la synthèse du cholestérol, de la prolifération cellulaire et de la synthèse protéique (*Steinberg et Kemp, 2009*). Son rôle possible dans le développement du DT2 et dans la régulation de la fonction de la cellule β est incertain. L'étude de modèles animaux obèses a montré une association entre une diminution d'activité d'AMPK et la résistance à l'insuline du foie (*Steinberg et Kemp, 2009*). De plus, l'exposition de cellules β à des concentrations élevées de glucose entraîne une inactivation d'AMPK associée à une diminution de l'oxydation des acides gras et une augmentation de leur estérification. L'importance d'AMPK dans le développement du DT2 est mise en lumière par le succès des agents thérapeutiques développés jusqu'à maintenant. En effet, la metformine, les thiazolidinediones et l'exercice sont des exemples d'interventions auprès des patients diabétiques qui permettent un contrôle de la glycémie et une amélioration de la sensibilité à l'insuline, et qui ont comme point commun l'activation de la protéine AMPK (*Viollet et al, 2007; Zhang et al, 2009*). Cependant, la compréhension du rôle d'AMPK dans la restauration de la fonction de la cellule β par ces thérapies reste sommaire.

À notre connaissance, nous sommes les premiers à démontrer qu'une exposition prolongée à une diète riche en gras inhibe l'activité d'AMPK dans la cellule β (article 3). Ceci va à l'encontre de notre hypothèse initiale selon laquelle l'augmentation de l'oxydation des acides gras observée dans les îlots DIO était associée à une activation accrue d'AMPK. Cependant, AMPK étant une protéine activée en réponse à une augmentation du ratio AMP/ATP observée entre autres en situation d'abondance de nutriments, il n'est donc pas si surprenant d'observer une diminution de son activité dans

les îlots de souris DIO. De plus, alors que la régulation d'HMGCR par AMPK est maintenue, nous observons une dissociation entre AMPK et sa cible ACC chez les souris HDR. Le niveau de phosphorylation d'ACC corrèle cependant avec la hausse d'oxydation des acides gras observée dans les îlots HDR. Des études dans le muscle squelettique ont démontré la régulation de l'oxydation des acides gras par ACC indépendamment de la voie AMPK, et ce en situation d'exercice prolongé où on observe une utilisation accrue des acides gras au détriment du glucose comme source énergétique (*Wojtaszewski et al*, 2002; *Thomson et al*, 2007). Elles suggèrent qu'ACC pourrait être phosphorylé par une autre kinase, ou que l'activation différentielle de certaines phosphatases contribuerait à la régulation d'ACC. Ainsi, la phosphorylation d'ACC dans les îlots HDR permettrait l'augmentation de l'oxydation des acides gras et donc la détoxification de ces molécules potentiellement toxiques pour la cellule β , en situation où le statut énergétique cause une inactivation d'AMPK. L'inactivation d'AMPK corrèle par contre avec le niveau de phosphorylation d'HMGCR, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des concentrations accrues de cholestérol observées dans les îlots HDR.

L'AMPK inhibe la synthèse des protéines et la prolifération cellulaire par son action inhibitrice de la voie de signalisation mTOR. L'inactivation d'AMPK induite par la diète riche en gras pourrait ainsi contribuer à l'augmentation de la prolifération observée dans les îlots HDR, ce qui pourrait faire partie d'un mécanisme compensatoire à la SIIG déficiente. Ainsi, malgré une perte de fonction des cellules β , l'augmentation de leur nombre est une tentative de sécréter assez d'insuline pour répondre aux besoins des tissus périphériques. Et de façon intéressante, nous observons un lien corrélatif entre la diminution d'activité d'AMPK, l'augmentation de la prolifération et l'insulinémie chez les souris DIO. La signalisation par la voie mTOR pourrait donc être très informative sur le rôle de l'AMPK dans la prolifération induite par une diète riche en gras dans les cellules β .

7.10 Autres considérations sur le rôle de l'AMPK dans la cellule β

Les familles des biguanides (ex. metformine) et des thiazolidinediones, dont la pioglitazone (une molécule agoniste de PPAR γ) est le seul membre encore approuvé par la *Food and Drug Administration*, regroupent des molécules reconnues pour leurs capacités à restaurer la sensibilité à l'insuline chez des patients pré-diabétiques ou DT2 (Ye *et al*, 2004; Semple *et al*, 2006; Viollet *et al*, 2007). Elles ont comme mode d'action commun l'activation de la kinase AMPK, mais les mécanismes sous-jacents à cette activation ne sont pas encore très bien connus. En plus de l'amélioration de la sensibilité à l'insuline, des études récentes démontrent que la pioglitazone contribuerait à la préservation de la fonction de la cellule β chez les patients diabétiques (Lamontagne *et al*, 2009; Gupta *et al*, 2010)(Lamontagne 2012, soumis à la revue Diabetes). En effet, des études réalisées dans notre laboratoire ont démontré les effets aigus de la pioglitazone *in vitro* et *in vivo*, permettant la 'décélération métabolique' de la cellule β (Lamontagne *et al*, résultats non publiés). Cette décélération métabolique a pour conséquence une diminution de la sécrétion d'insuline par la cellule β permettant ainsi de prévenir son épuisement (Lamontagne *et al*, 2009). Des effets similaires ont été observées suite à un traitement à la metformine, une des médications les plus utilisées chez les patients diabétiques à ce jour (Lamontagne et Prentki, résultats non publiés). En plus de ces approches pharmacologiques, l'exercice s'est avéré une intervention de choix pour l'amélioration de la glycémie de patients pré-diabétiques en lien avec une restauration de la sensibilité à l'insuline. L'exercice est aussi associé à une diminution de la sécrétion d'insuline par la cellule β en lien avec une activation d'AMPK (Calegari *et al*, 2011). Bref, ces approches thérapeutiques ont comme point commun l'activation de la protéine AMPK, le ralentissement de plusieurs processus métaboliques des cellules β , menant à une diminution de la sécrétion d'insuline. Ceci pourrait être interprété comme n'étant pas favorable au maintien adéquat de la glycémie, en particulier en tenant compte de la résistance à l'insuline qui apparaît très tôt dans chez les patients pré-diabétiques. En revanche, une autre interprétation est possible. Une diminution de la

sécrétion d'insuline permettrait de donner un répit à la cellule β pour ainsi prévenir son épuisement et sa dysfonction. Ceci ouvre un tout nouveau mode de pensée selon lequel la stimulation excessive des cellules β peut être propice au développement du DT2, et que le ralentissement du métabolisme cellulaire, par une drogue, une intervention comportementale ou une adaptation de l'organisme pourrait être salutaire pour la fonction de la cellule β .

Nous avons observé chez la souris DIO une diminution de l'activité de l'AMPK en association à une diminution de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose, ce qui est contraire aux observations de Lamontagne *et al.* 2009 dans le modèle de traitement à la pioglitazone où cette drogue active l'AMPK et diminue la sécrétion. Cependant, nous soupçonnons que d'autres voies moléculaires sont impliquées dans la diminution de sécrétion d'insuline observée dans les îlots DIO, comme l'accumulation de cholestérol discuté plus haut. De plus, les îlots traités de façon chronique avec des acides gras ou les îlots de souris DIO ont un défaut de l'exocytose des granules de sécrétion d'insuline comme démontré par le groupe de Rorsman (*Collins et al*, 2010). Le cholestérol membranaire en excès pourrait ainsi altérer l'exocytose des granules de sécrétion. Enfin il faut souligner que les expériences de Lamontagne *et al*, 2009 ont été faites sur des temps courts (environ 1 heure) alors que le modèle DIO implique des effets chroniques. Il est donc difficile de comparer ces études.

Les cibles de l'AMPK en lien avec la sécrétion d'insuline dans la cellule β sont encore méconnues. Leur identification nous permettra donc de mieux comprendre le lien entre la voie d'AMPK et la régulation de la sécrétion d'insuline.

7.11 PKC ϵ et sécrétion de l'insuline

La cellule β exprime les PKC classiques α et β II et, les PKC nouvelles δ et ϵ ainsi que les PKC atypiques ζ et λ (*Ishikawa et al*, 2005) mais toutes ne sont pas impliquées dans la régulation de la sécrétion d'insuline. En effet, les PKC atypiques affectent indirectement

la sécrétion en modulant l'expression de certains gènes importants pour la sécrétion d'insuline, dont le gène de l'insuline (PKC ζ) de même que GLUT2, SUR1 et KIR6.2 (PKC λ) (Liu *et al*, 2006). PKC ϵ quant à lui a récemment été identifié comme régulateur négatif de la lipolyse et de la sécrétion d'insuline en situation d'abondance d'acides gras (ex. suite à une diète riche en gras *in vivo* ou à une exposition prolongée à des acides gras *in vitro*) (Schmitz-Peiffer *et al*, 2007; Cantley *et al*, 2009; Raddatz *et al*, 2011). Cependant, le mécanisme par lequel cette régulation négative s'effectue n'est pas encore défini, entre autres en raison de la mauvaise connaissance des cibles protéiques de PKC ϵ dans la cellule β .

L'activité et la localisation de PKC ϵ sont modulées par plusieurs espèces d'acides gras. En effet, en plus d'être activé par les DAG, la translocation de PKC ϵ est aussi activée *in vitro* par certains phospholipides dont PIP3 et certains acides gras saturés ou insaturés (ex. l'acide linoléique et l'acide arachidonique) (Shirai *et al*, 1998). Ces différents acides gras semblent aussi diriger PKC ϵ vers différentes localisations intracellulaires, tel l'appareil de Golgi, les filaments d'actine (car PKC ϵ possède un domaine de liaison à cette protéine) ou la membrane plasmique (Prekeris *et al*, 1996; Akita, 2002; Cenni *et al*, 2002). PKC ϵ aurait aussi la capacité de s'associer aux granules d'insuline suite à une stimulation au glucose pour augmenter la sécrétion, mais ces résultats vont à l'encontre de l'étude de Cantley *et al*, 2009 selon laquelle PKC ϵ inhiberait la sécrétion d'insuline (Mendez *et al*, 2003). Ainsi, de par ses nombreuses molécules activatrices et sites de translocation, l'activité de PKC ϵ semble être modulée finement, ce qui sous-entend un rôle important pour l'homéostasie cellulaire en présence d'acides gras. Par ailleurs, une étude a démontré l'association d'une forme constitutivement active de PKC ϵ à la mitochondrie dans les tubules proximaux du rein, entraînant une dysfonction mitochondriale liée à la diminution de la respiration mitochondriale, de l'activité de l'ATP synthétase, de même qu'une augmentation du potentiel de membrane et la production de ROS (Nowak *et al*, 2011). Ces observations viennent appuyer l'implication de l'augmentation des niveaux de PKC ϵ observée chez les îlots DIO dans les modifications intracellulaires observées telles la

diminution des niveaux d'ATP et une hyperpolarisation mitochondriale chez les HDR. De plus, des études ont démontré que les PKC classiques et nouvelles pourraient activer l'enzyme NADPH oxydase, et ainsi contribuer à l'élévation des ROS en période d'abondance de nutriments (*Newsholme et al*, 2007; *Graciano et al*, 2011). L'augmentation de PKC ϵ pourrait ainsi contribuer au développement d'un stress oxydatif ce qui pourrait faire partie du mécanisme par lequel il inhibe la sécrétion. Des recherches plus approfondies devront être effectuées pour confirmer ce mécanisme.

L'obésité en association au DT2 est associée à une augmentation de l'expression et de l'activité de PKC ϵ dans plusieurs tissus. En effet, on observe une augmentation de l'expression de la protéine dans le muscle squelettique de rats obèse insulino-résistant ZF et une augmentation de sa localisation à la membrane plasmique dans le foie des rats diabétiques ZDF et de patients obèses et diabétiques (*Considine et al*, 1995; *Qu et al*, 1999; *Dey et al*, 2006). L'augmentation d'expression de PKC ϵ serait impliquée dans le développement de l'insulino-résistance par l'inhibition de la signalisation intracellulaire en aval du récepteur à l'insuline (*Dey et al*, 2006). L'augmentation de la protéine observée dans les îlots de souris DIO n'est donc pas surprenante et corrèle avec la diminution de sécrétion d'insuline observée dans ces îlots. Il est probable que l'augmentation des niveaux intracellulaires d'acides gras due à la diète contribue à l'activation de la protéine, quoi que cette activation n'ait pas été directement démontrée dans notre étude faute de méthodes expérimentales appropriées. PKC ϵ étant activé par des concentrations accrues d'acides gras intracellulaires, il est probablement impliqué dans la régulation de la deuxième phase de sécrétion d'insuline dans une cellule normale. Cependant, dans le modèle DIO, l'élévation chronique des acides gras cause probablement l'activation prolongée de PKC ϵ . Par ailleurs, *Cantley et al*, 2009 ont démontré que PKC ϵ régule la lipolyse, et l'élévation de cette kinase dans les îlots LDR et HDR corrèle avec la diminution de lipolyse observée dans ces îlots ce qui suggère que PKC ϵ pourrait être responsable en partie de la diminution de lipolyse mesurée (*Cantley et al*, 2009). De plus, les PKC sont impliqués dans le développement du cancer pour leur activité pro-prolifératives et anti-apoptotiques. PKC ϵ est impliqué dans

l'induction de l'invasion et de métastases du carcinome épidermoïde (*Verma et al*, 2006). Des études récentes montrent aussi l'implication de PKC ϵ dans le développement précoce d'hyperplasie de la prostate (*Benavides et al*, 2011). Il serait donc intéressant de vérifier la contribution de PKC ϵ dans l'augmentation de la masse des cellules β dans notre modèle DIO.

Enfin, nous observons une augmentation similaire des niveaux de PKC ϵ entre les souris LDR et HDR suggérant que ceci pourrait constituer un des premiers événements conduisant à la perte de fonction de la cellule β en condition de dyslipidémie et d'hyperglycémie. Ainsi, contrecarrer l'augmentation d'expression de PKC ϵ à un stade précoce pourrait contribuer à préserver la fonction de la cellule β , et avec une approche thérapeutique systémique, pourrait aider à restaurer la résistance à l'insuline.

7.12 Limitations des études présentées

Le premier article portant sur le rôle de la protéine SCHAD comme régulateur négatif de la sécrétion d'insuline a été réalisée sur une lignée cellulaire insulino-sécrétrice, les cellules INS832/13. Cette lignée cellulaire est couramment utilisée dans les études *in vitro* de sécrétion d'insuline dans notre laboratoire et elle constitue un modèle idéal pour les études mécanistiques nécessitant l'utilisation de siRNA et de grandes quantités de matériel biologique. Il eut été souhaitable de confirmer les résultats obtenus en îlots isolés de rat afin d'avoir un modèle plus physiologique démontrant l'effet de la diminution d'expression de SCHAD sur la sécrétion d'insuline. Cependant, l'îlot de Langerhans est formé de plusieurs types cellulaires, et en diminuant l'expression de SCHAD par siRNA, nous aurions alors mesuré la contribution des cellules β de l'îlot, mais aussi celle des autres types cellulaires, ce qui aurait pu fausser les résultats. De plus, nous avons une limitation technique, car la transfection de siRNA dans l'îlot entier est très difficile. En effet, en raison de la structure sphérique de l'îlot, il est très difficile de faire pénétrer les siRNA en son cœur où sont situées la majorité des cellules β chez les rongeurs. Nous avons envisagé de prolonger notre étude dans un modèle d'inactivation ubiquitaire de SCHAD chez la souris, mais cette

étude était déjà entreprise par deux autres groupes, nous avons donc décidé de ne pas s'engager dans cette voie. Heureusement, comme décrit précédemment, l'étude de ce modèle SCHAD KO par Martins *et al*, 2007 a mené à la proposition d'un mécanisme qui vient confirmer plusieurs hypothèses présentées dans notre modèle (Martins *et al*, 2011) .

L'étude portant sur les régulateurs négatifs de la sécrétion d'insuline dans le modèle DIO, ayant donné lieu aux deuxième et troisième articles de cette thèse, est une étude de longue haleine portant sur un modèle *in vivo* uniquement réalisable chez les rongeurs. Il s'agit d'une étude exhaustive des perturbations métaboliques dans la cellule β causées par une diète riche en gras. Une des limitations de cette étude vient du peu de matériel disponible lorsqu'on étudie l'îlot de Langerhans. L'îlot est une petite structure présente en petit nombre dans une souris (environ 300 îlots par souris, en comparaison à 1000 îlots par rats ou 150 000 îlots par pancréas humain). Nous sommes donc limités par la quantité de matériel obtenu, que ce soit au niveau protéique, pour des immunobuvardages de type Western, ou pour des expériences de PCR en temps réel par exemple. Ceci a été particulièrement limitant pour l'étude de l'activation de PKC ϵ , qui nécessitait la mesure de la translocation intracellulaire de la protéine par fractionnement cellulaire pour isoler les fractions nucléaires, cytosoliques et membranaires, qui n'ont pu être réalisées dans notre modèle. De plus, la souris DIO étant un modèle d'obésité et d'hyperglycémie induit par la diète, il était impossible pour nous de recréer un modèle similaire *in vitro* avec des cellules en culture afin de disséquer certains mécanismes plus aisément. Par ailleurs, afin d'expliquer la provenance de l'hyperpolarisation des mitochondries HDR, il eut été souhaitable de mesurer les concentrations de ROS produits dans les îlots suite à la diète riche en gras. Cependant, les outils disponibles sont peu spécifiques et il existe présentement un vaste débat dans la littérature en ce qui a trait à l'effet des ROS sur la sécrétion d'insuline. Ainsi, nous avons préféré suspendre l'étude des ROS dans le modèle DIO jusqu'à ce que de nouveaux outils soient disponibles et surtout, jusqu'à ce que nous ayons une meilleure compréhension du rôle des ROS sur la sécrétion d'insuline.

Chapitre 8. Perspectives

À la lumière des résultats obtenus au cours de mon projet de doctorat, la poursuite de l'étude des voies moléculaires responsables de la régulation négative de la sécrétion d'insuline pourrait se faire en deux temps. En premier lieu, il serait pertinent de vérifier si les acyl-CoA ou carnitine à chaîne courtes sont des facteurs de couplage métabolique, en plus de vérifier le rôle de SCHAD et de ces facteurs de couplage dans l'hyperinsulinémie présente en phase compensatoire du pré-diabète. En second temps, il serait important de caractériser le rôle d'AMPK dans la régulation de la sécrétion d'insuline de la cellule β , en plus d'évaluer l'importance de cette voie et de la dysfonction mitochondriale dans le développement du DT2.

Projet #1: Les acyl-CoA et –carnitine à courte chaîne sont-ils des facteurs de couplage métabolique?

Nous avons démontré que SCHAD agit comme soupape de sécurité afin de prévenir l'hypersecrétion par la cellule β . L'étude de la souris SCHAD KO par Li et al, 2010 démontre que SCHAD assure une régulation du métabolisme de la glutamine et du glutamate, sans effet sur la potentialisation de la sécrétion par le glucose, alors que l'étude d'une souris similaire par Schulz et al, 2011 ainsi que nos résultats suggèrent que SCHAD est aussi important dans la régulation de la SIIG (Li et al, 2010; Pepin et al, 2010; Schulz et al, 2011). La différence de fond génétique et la contribution de facteurs sécrétés par d'autres tissus (ex. le foie) pourraient expliquer les différents effets observés dans les deux souris KO. L'expression de SCHAD étant environ six fois supérieure à l'expression GDH, nous pensons que l'inhibition de GDH n'est pas le seul moyen par lequel SCHAD régule la sécrétion d'insuline (Li et al, 2010). Il serait donc intéressant de pousser plus loin notre étude initiale afin de vérifier si certaines molécules potentialisatrices de la sécrétion d'insuline s'accumulent en absence de SCHAD. SCHAD étant une enzyme impliquée dans l'oxydation des acides gras, nous posons l'hypothèse selon laquelle les substrats de la réaction d'oxydation par SCHAD, soit les acyl-CoA à chaîne courte ou leurs dérivés

carnitine, seraient des molécules importantes pour la sécrétion d'insuline. Nous suggérons aussi que l'activité de SCHAD régulerait négativement la SIIG en diminuant la production d'acyl-CoA et -carnitine, empêchant leur activité potentialisatrice sur la sécrétion d'insuline.

Afin de tester cette hypothèse, nous utiliserons dans un premier temps la diminution d'expression de SCHAD par siRNA afin de mesurer les concentrations des acyl-CoA ou acyl-carnitine à chaîne moyenne ou courte présents en plus grande quantité en absence de SCHAD par la méthode de LC-MSMS. Ces expériences permettront de confirmer que des molécules d'acyl-CoA ou -carnitine s'accumulent bien en absence de SCHAD et de déterminer l'identité de ces molécules. Par la suite, ces résultats seront validés dans un modèle murin d'inactivation de la protéine SCHAD spécifique à la cellule β . Le prélèvement du plasma de ces souris, d'extraits cytoplasmiques des îlots, ou du contenu relâché lors d'incubations d'îlots isolés à des concentrations variées de glucose permettra de mesurer les niveaux des acyl-CoA ou -carnitine identifiés dans le modèle *in vitro*. Il sera alors possible de vérifier si la cellule β contribue à l'élévation des concentrations circulantes et excrétées du 3-hydroxybutyryl-carnitine et du 3-hydroxyglutarate observées chez les patients porteurs d'une mutation de SCHAD. Il sera aussi possible de confirmer l'identité des molécules qui s'accumulent en absence de SCHAD. Suite à leur identification, l'évaluation de leur capacité à stimuler la sécrétion d'insuline *in vitro* sera mesurée. Pour ce faire, des cellules INS832/13 et des îlots isolés de souris seront traités à l'aide de concentrations croissantes des différentes molécules et l'amplitude de la sécrétion d'insuline en réponse au glucose sera mesurée. Au final, ce projet nous permettra d'identifier de nouveaux facteurs de couplages métaboliques et de comprendre leur implication dans la stimulation de la sécrétion d'insuline.

Projet #2: SCHAD est-il impliqué dans l'hyperinsulinémie présente dans la phase compensatoire de la cellule β dans le pré-diabète?

L'implication de SCHAD dans la compensation de la cellule β dans des individus ou modèles animaux intolérants au glucose ou pré-diabétiques n'a pas été étudiée. Il serait intéressant de savoir si la réduction d'expression de SCHAD existe dans ces situations et est un mécanisme permettant l'augmentation de la sécrétion d'insuline lors de la phase de compensation pour palier à l'insulino-résistance. Nous n'avons pas observé de différence d'expression dans les souris LDR ayant une insulinémie plus haute que les ND. Par contre, nous avons mesuré une diminution de l'expression de SCHAD dans les îlots de rats hyperinsulinémiques ZF (*Pepin et al*, 2010). Nous supposons donc que la diminution d'expression de SCHAD pourrait être un des mécanismes permettant une augmentation de l'insulinémie chez les patients pré-diabétiques en phase compensatoire de la fonction de la cellule β . Nous proposons donc de pousser l'étude plus loin en mesurant l'expression de SCHAD par l'évaluation des niveaux d'ARNm en plus de l'activité de la protéine dans les îlots de modèles de rongeurs hyperinsulinémiques, tels les souris db/db âgées de 6 semaines, qui sont alors légèrement hyperglycémiques et hyperinsulinémiques (*Kobayashi et al*, 2000), la souris ob/ob ou le rat GK jeune (pour éviter la perte massive de cellule β observée chez ce rat adulte) (*Kargar et Ktorza*, 2008). Par la suite, l'étude de l'expression de SCHAD par la mesure des niveaux d'ARNm et de la protéine dans les îlots humains de patients pré-diabétiques insulino-résistants pourrait apporter un soutien à l'hypothèse proposant une contribution de cet enzyme dans l'hyperinsulinémie transitionnelle de ce stade précoce du développement du DT2. Ultimement, si nous démontrons qu'une diminution d'expression de SCHAD est observée dans ces différents modèles, il serait important d'évaluer la présence accrue des molécules d'acyl-CoA ou -carnitine identifiées au cours du projet #1 afin de démontrer leur implication dans l'hyperinsulinémie caractéristique des phases précoces de DT2.

Projet #3: La dysfonction mitochondriale de la cellule β est-elle causale dans le développement précoce du DT2?

Les études réalisées par l'équipe du Dr Patti révèlent l'importance de la dysfonction mitochondriale dans le développement du DT2, particulièrement dans le muscle squelettique. Ces études démontrent que l'expression de plusieurs gènes de la phosphorylation oxydative est légèrement diminuée chez les patients T2D, et que c'est l'accumulation de ces petites modifications qui entraîne la dysfonction de la mitochondrie (*Patti et Corvera, 2010*). Ainsi, le métabolisme mitochondrial étant central à la fonction de la cellule β , il est raisonnable d'avancer que tout comme dans le muscle, plusieurs petites modulations de l'homéostasie mitochondriale pourraient mener à la dysfonction de la cellule β observée chez les individus diabétiques. Dans notre étude du modèle DIO, nous n'avons observé aucune altération de la consommation d'oxygène en réponse au glucose. Par contre, les souris HDR ont un potentiel de membrane mitochondrial plus grand qui ne résulte toutefois pas en une augmentation de la production d'ATP. De façon intéressante, une étude publiée en 2007 a démontré que le traitement de cellule INS1 à des concentrations élevées de glucose et d'acides gras (conditions qui s'apparentent à la diète riche en gras) cause une diminution d'expression de la sous-unité β de l'ATP synthétase, induisant une diminution de la production d'ATP (*Kohnke et al, 2007*). Nous posons l'hypothèse selon laquelle l'augmentation du potentiel de membrane mitochondrial observé chez les îlots HDR serait accompagnée de plusieurs modifications légères d'autres fonctions mitochondriales, ce qui pourrait contribuer à une diminution de la SIIG. En particulier, nous proposons que les îlots HDR aient une diminution d'activité de l'ATP synthétase, un changement d'activité des complexes de la CTE, une altération structurale des mitochondries ou une production différentes de ROS. Afin de le vérifier, nous mesurerons tout d'abord l'expression des différentes sous-unités de l'ATP synthétase par RT-PCR et immunobuvardage de type Western, en particulier la sous-unité β , dans les îlots des souris LDR et HDR, en comparaison aux souris ND. Il sera aussi approprié de mesurer l'expression de certains gènes impliqués dans la biogénèse des mitochondries, tels PGC1 α

et NRF1. Afin de mesurer les changements d'activité des complexes de la CTE, nous disséquons l'activité de chaque complexe par la technologie Seahorse en utilisant différents inhibiteurs de la chaîne (oligomycine, roténone/antimycine, FCCP). La technologie Seahorse permet de mesurer la consommation d'oxygène de cellules suite à divers traitements (possibilité de quatre traitements différents) dans un format de plaque 12 ou 96 puits. Cette technologie remplace l'électrode de Clark et permet l'analyse d'un plus grand nombre d'échantillons à la fois. Bien que nous ne voyons pas de différence de consommation d'oxygène suite à une stimulation au glucose, peut-être que les mitochondries HDR sont légèrement plus découplées que les mitochondries LDR, et ceci pourrait moduler la sécrétion d'insuline basale, par exemple. La production de ROS pourrait être augmentée à consommation égale d'oxygène. Enfin, une étude morphologique des îlots des souris DIO par microscopie électronique pourrait révéler des altérations dans la structure des mitochondries. Il serait important de vérifier l'intégrité des cristaes de même que la densité des mitochondries dans les îlots. De plus, des études par microscopie à fluorescence nous permettront de mesurer la proportion des mitochondries actives à l'aide de marqueurs mitochondriaux fluorescents tels la rhodamine 123 ou le TMRE (tétraméthyl-rhodamine éthyl ester) suite à la diète riche en gras. Nous serions aussi aptes à vérifier l'intégrité du réseau mitochondrial et des processus d'autophagie des mitochondries, afin de déceler des problèmes potentiels de fonction ou de recyclage des mitochondries défectueuses induits par la diète.

Par ailleurs, nos résultats de potentiel de membrane et d'ATP, en présence de concentrations élevées de nutriments dans les cellules β des souris DIO, suggèrent une production accrue de ROS. Donc, par des méthodes de microscopie confocale et en utilisant des marqueurs fluorescents spécifiques aux différentes espèces de ROS, nous mesurerons les quantités de ROS générées dans les îlots DIO suite à une stimulation au glucose. Il serait aussi très pertinent d'évaluer de façon exhaustive le lien entre l'exposition de cellules β ou d'îlots isolés à des concentrations croissantes de glucose, d'acide gras ou d'antioxydants, la sécrétion d'insuline et la production de ROS. Les recherches récentes ne s'entendent pas sur le rôle que les ROS peuvent avoir dans la cellule β , et ce en fonction de

leur concentration. Le débat étant très dynamique en ce moment en ce qui a trait au rôle des ROS dans la potentialisation de la sécrétion d'insuline, il sera primordial de faire la lumière sur cette question.

Projet #4 : Quel est le rôle de l'AMPK dans la régulation du métabolisme des cellules β dans un contexte de DT2?

Plusieurs cibles de l'AMPK ont été identifiées dans les tissus tels le muscle squelettique et le tissu adipeux permettant la régulation de nombreuses fonctions cellulaires (*Hardie, 2004*). Cependant, nous connaissons mal l'importance de cette protéine et de ses cibles dans la régulation des divers procédés métaboliques de la cellule β . Dans notre étude, nous observons une diminution importante de l'activité basale d'AMPK dans les îlots LDR et particulièrement HDR. Ceci suggère que l'inhibition de l'activité d'AMPK est un événement important dans le développement de la dysfonction de la cellule β dans un contexte de DT2. Dans les adipocytes, l'AMPK est connu pour inhiber l'activité de la lipase HSL. De plus, l'analyse du tissu adipeux chez des souris DIO a montré une diminution de l'activité d'AMPK et de la lipolyse, similaire à nos observations dans la cellule β des souris HDR, en plus d'une diminution de l'activité d'HSL (*Gaidhu et al, 2010*). Enfin, la lipase ATGL est aussi phosphorylée par AMPK dans le tissu adipeux (*Ahmadian et al, 2011*). Nous proposons donc qu'AMPK serait impliqué dans la régulation de la lipolyse dans la cellule β par la phosphorylation des protéines HSL et ATGL. De plus, étant donné que la lipolyse permet le relâchement de molécules signalétiques lipidiques importantes pour la sécrétion d'insuline et qu'AMPK est associé à une régulation négative de la sécrétion, nous proposons qu'AMPK inhibe la sécrétion d'insuline en modulant l'activité lipolytique de la cellule β . Pour tester ces hypothèses, nous proposons d'identifier les sites de phosphorylation d'AMPK sur les protéines HSL et ATGL par une analyse bioinformatique. Par la suite, la validation de ces sites sera effectuée par la surexpression de mutants spécifiques aux sites de phosphorylation identifiés afin d'évaluer leur effet sur

la lipolyse dans les cellules INS832/13. Par la suite, l'implication de la phosphorylation des lipases sur la sécrétion d'insuline sera mesurée en utilisant les mêmes mutants de ces lipases et en mesurant leur effet sur la sécrétion d'insuline. Ultimement, le développement d'anticorps spécifiques pour les sites de phosphorylation clé permettrait d'identifier le mode de régulation d'AMPK sur les lipases dans différents modèles de pré-diabète tel la souris DIO par analyse d'immunobuvardage de type Western.

Chapitre 9. Conclusion

Les études réalisées au cours de cette thèse de doctorat ont permis de mettre en lumière des mécanismes importants de régulation négative de la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique. Tout d'abord, nos études suggèrent que la protéine SCHAD est importante dans l'atténuation de la sécrétion d'insuline induite par le glucose et certains acides aminés (glutamine et leucine). Pour expliquer cet effet, nous avons proposé que le métabolisme des acides gras par la protéine SCHAD empêche l'accumulation d'acyl-carnitine à chaîne courtes potentialisatrices de la sécrétion d'insuline, dont l'accumulation en absence de SCHAD induit une hyperinsulinémie. De plus, nous avons obtenu des résultats suggérant que SCHAD régule le métabolisme du glutamate, ce qui a été confirmé par l'étude *in vivo* de la souris SCHAD KO.

Par ailleurs, notre étude de la dysfonction de la cellule β dans un modèle de souris pré-diabétiques ayant des degrés divers d'hyperglycémie (LDR et HDR) a mis en lumière divers mécanismes liés au métabolisme des acides gras impliqués dans le développement du diabète à différents stades. Tout d'abord, l'état «pré-diabétique» chez la souris DIO-LDR est marqué par une dysfonction partielle de la sécrétion d'insuline, accompagnée d'un ralentissement de l'estérification et de la lipolyse des acides gras par le cycle TG/FFA. Le passage d'une hyperglycémie légère chez la souris LDR à une hyperglycémie plus prononcée chez la souris HDR est marqué par une dysfonction sécrétoire plus importante, liée à une augmentation du métabolisme oxydatif des acides gras. Ce passage est aussi accompagné d'une prolifération menant à l'augmentation de la masse des cellules β et de divers changements moléculaires. D'abord, nous avons démontré que l'augmentation de l'expression de la kinase PKC ϵ est un événement précoce, observé tôt dans le développement de l'hyperglycémie, qui pourrait être impliqué dans l'inhibition de la lipolyse entraînant la diminution de la SIIG. Ensuite, nous avons démontré pour la première fois une diminution de l'activité d'AMPK dans les îlots DIO, présente au stade précoce d'hyperglycémie (LDR) mais beaucoup plus marquée chez les souris atteintes de dysfonction pancréatique plus sévère (HDR). Cette diminution d'activité d'AMPK corrèle avec une diminution de l'activation d'HMGCR, ce qui pourrait expliquer l'augmentation des concentrations de cholestérol des îlots HDR. La diminution d'activité d'AMPK pourrait

aussi expliquer l'élévation de la prolifération et de la masse des cellules β observées de façon légère chez les LDR, mais plus marquée chez les HDR. De plus, nous observons une dissociation d'AMPK de sa cible ACC, pour une raison qui n'est pas encore très bien comprise. Par contre, cette dissociation unique aux îlots HDR pourrait être un événement important dans l'induction d'une dysfonction liée à l'hyperglycémie accrue, expliquerait l'augmentation de l'oxydation des acides gras et pourrait faire partie d'un mécanisme de détoxification des acides gras dans une tentative ultime d'assurer la survie de la cellule β , même si sa fonction est diminuée. Enfin, nous démontrons que la fonction mitochondriale n'est pas altérée de façon prononcée dans les îlots des souris DIO, mais que des modifications légères dans les mécanismes énergétiques et oxydatifs mitochondriaux pourraient entraîner le développement de la dysfonction de la cellule β .

En résumé, nous avons mis en lumière des mécanismes importants pour la régulation négative de la sécrétion d'insuline dans la cellule β pancréatique saine ou en situation pathologique. Ces mécanismes permettent d'une part de limiter l'amplitude ou la durée de la sécrétion d'insuline suite à un repas chez la cellule saine. D'autre part, dans les phases précoces du développement du DT2, ces mécanismes pourraient refléter le fruit d'une adaptation de la cellule à la présence d'un excès de nutriments. Ils permettent de limiter la capacité des nutriments à stimuler la sécrétion d'insuline, ce qui peut être néfaste pour contrôle de la glycémie face à la résistance des tissus périphériques à l'insuline. Cependant, ces mécanismes de régulation négative de la sécrétion servent à préserver la fonction de la cellule β en retardant l'épuisement de celle-ci. Des études de notre laboratoire ont d'ailleurs démontré que la pioglitazone ralentit le métabolisme intracellulaire de la cellule β ayant pour conséquence une diminution de la sécrétion d'insuline, ce qui serait bénéfique à plus long terme pour la préservation de la fonction de la cellule β . Ainsi, à la lumière de nos recherches, le développement de thérapies ayant pour cible les mécanismes de régulation négative de la sécrétion d'insuline pourrait être bénéfique pour le traitement de patients pré-diabétiques.

Bibliographie

- Adiels M, Olofsson SO, Taskinen MR, Boren J. Overproduction of very low-density lipoproteins is the hallmark of the dyslipidemia in the metabolic syndrome. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2008;28(7):1225-36.
- Agren A, Borg K, Brolin SE, Carlman J, Lundqvist G. Hydroxyacyl CoA dehydrogenase, an enzyme important in fat metabolism in different cell types in the islets of Langerhans. *Diabetes & metabolism*. 1977;3(3):169-72.
- Ahmadian M, Abbott MJ, Tang T, Hudak CS, Kim Y, Bruss M, Hellerstein MK, Lee HY, Samuel VT, Shulman GI, Wang Y, Duncan RE, Kang C, Sul HS. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metabolism*. 2011;13(6):739-48.
- Aizawa T, Sato Y, Ishihara F, Taguchi N, Komatsu M, Suzuki N, Hashizume K, Yamada T. ATP-sensitive K⁺ channel-independent glucose action in rat pancreatic beta-cell. *American Journal of Physiology*. 1994;266(3 Pt 1):C622-7.
- Akita Y. Protein kinase C-epsilon (PKC-epsilon): its unique structure and function. *Journal of biochemistry*. 2002;132(6):847-52.
- Anello M, Lupi R, Spampinato D, Piro S, Masini M, Boggi U, Del Prato S, Rabuazzo AM, Purrello F, Marchetti P. Functional and morphological alterations of mitochondria in pancreatic beta cells from type 2 diabetic patients. *Diabetologia*. 2005;48(2):282-9.
- Anthonsen MW, Ronnstrand L, Wernstedt C, Degerman E, Holm C. Identification of novel phosphorylation sites in hormone-sensitive lipase that are phosphorylated in response to isoproterenol and govern activation properties in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(1):215-21.
- Arora SO, S.K. and Vohora, D. Characterisation of Streptozotocin Induced Diabetes Mellitus in Swiss Albino Mice. *Global Journal of Pharmacology*. 2009;3(2):81-4.
- Arsov T, Larter CZ, Nolan CJ, Petrovsky N, Goodnow CC, Teoh NC, Yeh MM, Farrell GC. Adaptive failure to high-fat diet characterizes steatohepatitis in *Alms1* mutant mice. *Biochemical and biophysical research communications*. 2006;342(4):1152-9.
- Ashcroft FM, Rorsman P. ATP-sensitive K⁺ channels: a link between B-cell metabolism and insulin secretion. *Biochemical Society Transactions*. 1990;18(1):109-11.
- Baggio LL, Drucker DJ. Therapeutic approaches to preserve islet mass in type 2 diabetes. *Annual Review of Medicine*. 2006;57:265-81.

- Bahl JJ, Bressler R. The pharmacology of carnitine. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 1987;27:257-77.
- Bajaj M, Pratipanawatr T, Berria R, Pratipanawatr W, Kashyap S, Cusi K, Mandarino L, DeFronzo RA. Free fatty acids reduce splanchnic and peripheral glucose uptake in patients with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(10):3043-8.
- Barroso I, Luan J, Sandhu MS, Franks PW, Crowley V, Schafer AJ, O'Rahilly S, Wareham NJ. Meta-analysis of the Gly482Ser variant in PPARGC1A in type 2 diabetes and related phenotypes. *Diabetologia*. 2006;49(3):501-5.
- Barycki JJ, O'Brien LK, Bratt JM, Zhang R, Sanishvili R, Strauss AW, Banaszak LJ. Biochemical characterization and crystal structure determination of human heart short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase provide insights into catalytic mechanism. *Biochemistry*. 1999;38(18):5786-98.
- Bauer CS, Woolley RJ, Teschemacher AG, Seward EP. Potentiation of exocytosis by phospholipase C-coupled G-protein-coupled receptors requires the priming protein Munc13-1. *The Journal of Neuroscience*. 2007;27(1):212-9.
- Bays HE, Gonzalez-Campoy JM, Bray GA, Kitabchi AE, Bergman DA, Schorr AB, Rodbard HW, Henry RR. Pathogenic potential of adipose tissue and metabolic consequences of adipocyte hypertrophy and increased visceral adiposity. *Expert Review of Cardiovascular Therapy*. 2008;6(3):343-68.
- Beall C, Piipari K, Al-Qassab H, Smith MA, Parker N, Carling D, Viollet B, Withers DJ, Ashford ML. Loss of AMP-activated protein kinase alpha2 subunit in mouse beta-cells impairs glucose-stimulated insulin secretion and inhibits their sensitivity to hypoglycaemia. *The Biochemical journal*. 2010;429(2):323-33.
- Bell JA, Reed MA, Consitt LA, Martin OJ, Haynie KR, Hulver MW, Muoio DM, Dohm GL. Lipid partitioning, incomplete fatty acid oxidation, and insulin signal transduction in primary human muscle cells: effects of severe obesity, fatty acid incubation, and fatty acid translocase/CD36 overexpression. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(7):3400-10.
- Belsham GJ, Brownsey RW, Hughes WA, Denton RM. Anti-insulin receptor antibodies mimic the effects of insulin on the activities of pyruvate dehydrogenase and acetylCoA carboxylase and on specific protein phosphorylation in rat epididymal fat cells. *Diabetologia*. 1980;18(4):307-12.

- Benavides F, Blando J, Perez CJ, Garg R, Conti CJ, DiGiovanni J, Kazanietz MG. Transgenic overexpression of PKCepsilon in the mouse prostate induces preneoplastic lesions. *Cell cycle*. 2011;10(2):268-77.
- Bender K, Maechler P, McClenaghan NH, Flatt PR, Newsholme P. Overexpression of the malate-aspartate NADH shuttle member Aralar1 in the clonal beta-cell line BRIN-BD11 enhances amino-acid-stimulated insulin secretion and cell metabolism. *Clinical Science*. 2009;117(9):321-30.
- Bennett MJ, Russell LK, Tokunaga C, Narayan SB, Tan L, Seegmiller A, Boriack RL, Strauss AW. Reye-like syndrome resulting from novel missense mutations in mitochondrial medium- and short-chain l-3-hydroxy-acyl-CoA dehydrogenase. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2006;89(1-2):74-9.
- Bergen WG, Mersmann HJ. Comparative aspects of lipid metabolism: impact on contemporary research and use of animal models. *The Journal of nutrition*. 2005;135(11):2499-502.
- Bergman RN, Ader M. Free fatty acids and pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2000;11(9):351-6.
- Bevilacqua S, Bonadonna R, Buzzigoli G, Boni C, Ciociaro D, Maccari F, Giorico MA, Ferrannini E. Acute elevation of free fatty acid levels leads to hepatic insulin resistance in obese subjects. *Metabolism*. 1987;36(5):502-6.
- Biden TJ, Schmitz-Peiffer C, Burchfield JG, Gurisik E, Cantley J, Mitchell CJ, Carpenter L. The diverse roles of protein kinase C in pancreatic beta-cell function. *Biochemical Society Transactions*. 2008;36(Pt 5):916-9.
- Birktoft JJ, Holden HM, Hamlin R, Xuong NH, Banaszak LJ. Structure of L-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase: preliminary chain tracing at 2.8-A resolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1987;84(23):8262-6.
- Bleich S, Cutler D, Murray C, Adams A. Why is the developed world obese? *Annual Review of Public Health*. 2008;29:273-95.
- Bonnefond A, Froguel P, Vaxillaire M. The emerging genetics of type 2 diabetes. *Trends in molecular medicine*. 2010;16(9):407-16.
- Bottalico JN. Recurrent gestational diabetes: risk factors, diagnosis, management, and implications. *Seminars in Perinatology*. 2007;31(3):176-84.

- Bouvier M, Moffett S, Loisel TP, Mouillac B, Hebert T, Chidiac P. Palmitoylation of G-protein-coupled receptors: a dynamic modification with functional consequences. *Biochemical Society Transactions*. 1995;23(1):116-20.
- Branstrom R, Corkey BE, Berggren PO, Larsson O. Evidence for a unique long chain acyl-CoA ester binding site on the ATP-regulated potassium channel in mouse pancreatic beta cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(28):17390-4.
- Bray GA. The Zucker-fatty rat: a review. *Federation proceedings*. 1977;36(2):148-53.
- Briaud I, Harmon JS, Kelpie CL, Segu VB, Poitout V. Lipotoxicity of the pancreatic beta-cell is associated with glucose-dependent esterification of fatty acids into neutral lipids. *Diabetes*. 2001;50(2):315-21.
- Briscoe CP, Tadayyon M, Andrews JL, Benson WG, Chambers JK, Eilert MM, Ellis C, Elshourbagy NA, Goetz AS, Minnick DT, Murdock PR, Sauls HR, Jr., Shabon U, Spinage LD, Strum JC, Szekeres PG, Tan KB, Way JM, Ignar DM, Wilson S, Muir AI. The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(13):11303-11.
- Brun T, Roche E, Assimacopoulos-Jeannet F, Corkey BE, Kim KH, Prentki M. Evidence for an anaplerotic/malonyl-CoA pathway in pancreatic beta-cell nutrient signaling. *Diabetes*. 1996;45(2):190-8.
- Brunham LR, Kruit JK, Pape TD, Timmins JM, Reuwer AQ, Vasanji Z, Marsh BJ, Rodrigues B, Johnson JD, Parks JS, Verchere CB, Hayden MR. Beta-cell ABCA1 influences insulin secretion, glucose homeostasis and response to thiazolidinedione treatment. *Nature Medicine*. 2007;13(3):340-7.
- Brunmair B, Staniek K, Gras F, Scharf N, Althaym A, Clara R, Roden M, Gnaiger E, Nohl H, Waldhausl W, Fornsinn C. Thiazolidinediones, like metformin, inhibit respiratory complex I: a common mechanism contributing to their antidiabetic actions? *Diabetes*. 2004;53(4):1052-9.
- Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radical Biology & Medicine*. 1995;18(4):775-94.
- Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. third edition ed. Saunders, editor. St-Louis, MO1999.
- Buteau J, Foisy S, Rhodes CJ, Carpenter L, Biden TJ, Prentki M. Protein kinase C ζ activation mediates glucagon-like peptide-1-induced pancreatic beta-cell proliferation. *Diabetes*. 2001;50(10):2237-43.

- Buteau J, El-Assaad W, Rhodes CJ, Rosenberg L, Joly E, Prentki M. Glucagon-like peptide-1 prevents beta cell glucolipotoxicity. *Diabetologia*. 2004;47(5):806-15.
- Butler AE, Janson J, Bonner-Weir S, Ritzel R, Rizza RA, Butler PC. Beta-cell deficit and increased beta-cell apoptosis in humans with type 2 diabetes. *Diabetes*. 2003a;52(1):102-10.
- Butler AE, Janson J, Soeller WC, Butler PC. Increased beta-cell apoptosis prevents adaptive increase in beta-cell mass in mouse model of type 2 diabetes: evidence for role of islet amyloid formation rather than direct action of amyloid. *Diabetes*. 2003b;52(9):2304-14.
- Calegari VC, Zoppi CC, Rezende LF, Silveira LR, Carneiro EM, Boschero AC. Endurance training activates AMP-activated protein kinase, increases expression of uncoupling protein 2 and reduces insulin secretion from rat pancreatic islets. *The Journal of endocrinology*. 2011;208(3):257-64.
- Cantley J, Burchfield JG, Pearson GL, Schmitz-Peiffer C, Leitges M, Biden TJ. Deletion of PKCepsilon selectively enhances the amplifying pathways of glucose-stimulated insulin secretion via increased lipolysis in mouse beta-cells. *Diabetes*. 2009;58(8):1826-34.
- Carling D, Clarke PR, Zammit VA, Hardie DG. Purification and characterization of the AMP-activated protein kinase. Copurification of acetyl-CoA carboxylase kinase and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase kinase activities. *European journal of biochemistry / FEBS*. 1989;186(1-2):129-36.
- Carpenter L, Mitchell CJ, Xu ZZ, Poronnik P, Both GW, Biden TJ. PKC alpha is activated but not required during glucose-induced insulin secretion from rat pancreatic islets. *Diabetes*. 2004;53(1):53-60.
- Casimir M, Rubi B, Frigerio F, Chaffard G, Maechler P. Silencing of the mitochondrial NADH shuttle component aspartate-glutamate carrier AGC1/Aralar1 in INS-1E cells and rat islets. *Biochemical Journal*. 2009;424(3):459-66.
- CDA. Lignes directrices de pratique clinique 2008 de l'association canadienne du diabète pour la prévention et le traitement du diabète au Canada. *Canadian Journal of Diabetes*. 2008;32(S2):S1-S225.
- Cenni V, Doppler H, Sonnenburg ED, Maraldi N, Newton AC, Toker A. Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *The Biochemical journal*. 2002;363(Pt 3):537-45.

- Chen C, Bumbalo L, Leahy JL. Increased catalytic activity of glucokinase in isolated islets from hyperinsulinemic rats. *Diabetes*. 1994a;43(5):684-9.
- Chen C, Hosokawa H, Bumbalo LM, Leahy JL. Mechanism of compensatory hyperinsulinemia in normoglycemic insulin-resistant spontaneously hypertensive rats. Augmented enzymatic activity of glucokinase in beta-cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1994b;94(1):399-404.
- Chen D, Wang MW. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2005;7(4):307-17.
- Chen S, Ogawa A, Ohneda M, Unger RH, Foster DW, McGarry JD. More direct evidence for a malonyl-CoA-carnitine palmitoyltransferase I interaction as a key event in pancreatic beta-cell signaling. *Diabetes*. 1994c;43(7):878-83.
- Chimienti F, Devergnas S, Pattou F, Schuit F, Garcia-Cuenca R, Vandewalle B, Kerr-Conte J, Van Lommel L, Grunwald D, Favier A, Seve M. In vivo expression and functional characterization of the zinc transporter ZnT8 in glucose-induced insulin secretion. *Journal of cell science*. 2006;119(Pt 20):4199-206.
- Clark JB, Palmer CJ, Shaw WN. The diabetic Zucker fatty rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. Society for Experimental Biology and Medicine. 1983;173(1):68-75.
- Clayton PT, Eaton S, Aynsley-Green A, Edginton M, Hussain K, Krywawych S, Datta V, Malingre HE, Berger R, van den Berg IE. Hyperinsulinism in short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency reveals the importance of beta-oxidation in insulin secretion. *Journal of Clinical Investigation*. 2001;108(3):457-65.
- Collins SC, Hoppa MB, Walker JN, Amisten S, Abdulkader F, Bengtsson M, Fearnside J, Ramracheya R, Toye AA, Zhang Q, Clark A, Gauguier D, Rorsman P. Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca₂(+) channels from secretory vesicles. *Diabetes*. 2010;59(5):1192-201.
- Considine RV, Caro JF. Protein kinase C: mediator or inhibitor of insulin action? *Journal of Cellular Biochemistry*. 1993;52(1):8-13.
- Considine RV, Nyce MR, Allen LE, Morales LM, Triester S, Serrano J, Colberg J, Lanza-Jacoby S, Caro JF. Protein kinase C is increased in the liver of humans and rats with non-insulin-dependent diabetes mellitus: an alteration not due to hyperglycemia. *The Journal of clinical investigation*. 1995;95(6):2938-44.

- Corkey BE, Deeney JT, Yaney GC, Tornheim K, Prentki M. The role of long-chain fatty acyl-CoA esters in beta-cell signal transduction. *Journal of Nutrition*. 2000;130(2S Suppl):299S-304S.
- Cusi K, Maezono K, Osman A, Pendergrass M, Patti ME, Pratipanawatr T, DeFronzo RA, Kahn CR, Mandarino LJ. Insulin resistance differentially affects the PI 3-kinase- and MAP kinase-mediated signaling in human muscle. *Journal of Clinical Investigation*. 2000;105(3):311-20.
- da Silva Xavier G, Leclerc I, Varadi A, Tsuboi T, Moule SK, Rutter GA. Role for AMP-activated protein kinase in glucose-stimulated insulin secretion and preproinsulin gene expression. *The Biochemical journal*. 2003;371(Pt 3):761-74.
- da Silva Xavier G, Mondragon A, Sun G, Chen L, McGinty JA, French PM, Rutter GA. Abnormal glucose tolerance and insulin secretion in pancreas-specific Tcf7l2-null mice. *Diabetologia*. 2012;55(10):2667-76.
- Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajduch E, Ferre P, Foufelle F. Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(26):25250-7.
- de Lonlay P, Giurgea I, Sempoux C, Touati G, Jaubert F, Rahier J, Ribeiro M, Brunelle F, Nihoul-Fekete C, Robert JJ, Saudubray JM, Stanley C, Bellanne-Chantelot C. Dominantly inherited hyperinsulinaemic hypoglycaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2005;28(3):267-76.
- de Oliveira CA, Latorraca MQ, de Mello MA, Carneiro EM. Mechanisms of insulin secretion in malnutrition: modulation by amino acids in rodent models. *Amino Acids*. 2011;40(4):1027-34.
- Deeney JT, Gromada J, Hoy M, Olsen HL, Rhodes CJ, Prentki M, Berggren PO, Corkey BE. Acute stimulation with long chain acyl-CoA enhances exocytosis in insulin-secreting cells (HIT T-15 and NMRI beta-cells). *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(13):9363-8.
- Deeney JT, Kohler M, Kubik K, Brown G, Schultz V, Tornheim K, Corkey BE, Berggren PO. Glucose-induced metabolic oscillations parallel those of Ca(2+) and insulin release in clonal insulin-secreting cells. A multiwell approach to oscillatory cell behavior. *Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(40):36946-50.
- DeFronzo RA. Lilly lecture 1987. The triumvirate: beta-cell, muscle, liver. A collusion responsible for NIDDM. *Diabetes*. 1988;37(6):667-87.

- DeFronzo RA. Banting Lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773-95.
- Del Rio G, Procopio M, Bondi M, Marrama P, Menozzi R, Oleandri SE, Grottoli S, Maccario M, Velardo A, Ghigo E. Cholinergic enhancement by pyridostigmine increases the insulin response to glucose load in obese patients but not in normal subjects. *International journal of obesity and related metabolic disorders*. 1997;21(12):1111-4.
- Dey D, Basu D, Roy SS, Bandyopadhyay A, Bhattacharya S. Involvement of novel PKC isoforms in FFA induced defects in insulin signaling. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2006;246(1-2):60-4.
- Dezaki K, Kakei M, Yada T. Ghrelin uses Galphai2 and activates voltage-dependent K⁺ channels to attenuate glucose-induced Ca²⁺ signaling and insulin release in islet beta-cells: novel signal transduction of ghrelin. *Diabetes*. 2007;56(9):2319-27.
- Doria A, Patti ME, Kahn CR. The emerging genetic architecture of type 2 diabetes. *Cell Metabolism*. 2008;8(3):186-200.
- Drew BG, Duffy SJ, Formosa MF, Natoli AK, Henstridge DC, Penfold SA, Thomas WG, Mukhamedova N, de Courten B, Forbes JM, Yap FY, Kaye DM, van Hall G, Febbraio MA, Kemp BE, Sviridov D, Steinberg GR, Kingwell BA. High-density lipoprotein modulates glucose metabolism in patients with type 2 diabetes mellitus. *Circulation*. 2009;119(15):2103-11.
- Drucker DJ. The biology of incretin hormones. *Cell Metabolism*. 2006;3(3):153-65.
- Duplus E, Glorian M, Forest C. Fatty acid regulation of gene transcription. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(40):30749-52.
- Eaton S, Chatziandreou I, Krywawych S, Pen S, Clayton PT, Hussain K. Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency associated with hyperinsulinism: a novel glucose-fatty acid cycle? *Biochemical Society Transactions*. 2003;31(Pt 6):1137-9.
- El-Assaad W, Buteau J, Peyot ML, Nolan C, Roduit R, Hardy S, Joly E, Dbaiibo G, Rosenberg L, Prentki M. Saturated fatty acids synergize with elevated glucose to cause pancreatic beta-cell death. *Endocrinology*. 2003;144(9):4154-63.
- El-Assaad W, Joly E, Barbeau A, Sladek R, Buteau J, Maestre I, Pepin E, Zhao S, Iglesias J, Roche E, Prentki M. Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes

- mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 ss-cells. *Endocrinology*. 2010;151(7):3061-73.
- El-Assaad WJ, E. Barbeau, A. Sladek, R. Buteau, J. Maestre, I. Pepin, E. Zhao, S. Iglesias, J. Roche, E. Prentki, M. Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 β -cells. *Endocrinology*. 2010;Article in review.
- Fahien LA, MacDonald MJ. The succinate mechanism of insulin release. *Diabetes*. 2002;51(9):2669-76.
- Farfari S, Schulz V, Corkey B, Prentki M. Glucose-regulated anaplerosis and cataplerosis in pancreatic beta-cells: possible implication of a pyruvate/citrate shuttle in insulin secretion. *Diabetes*. 2000;49(5):718-26.
- Feige JN, Auwerx J. Transcriptional targets of sirtuins in the coordination of mammalian physiology. *Current Opinion in Cell Biology*. 2008;20(3):303-9.
- Feige JN, Lagouge M, Canto C, Strehle A, Houten SM, Milne JC, Lambert PD, Matakis C, Elliott PJ, Auwerx J. Specific SIRT1 activation mimics low energy levels and protects against diet-induced metabolic disorders by enhancing fat oxidation. *Cell Metabolism*. 2008;8(5):347-58.
- Fekete CN, de Lonlay P, Jaubert F, Rahier J, Brunelle F, Saudubray JM. The surgical management of congenital hyperinsulinemic hypoglycemia in infancy. *Journal of Pediatric Surgery*. 2004;39(3):267-9.
- Fex M, Nitert MD, Wierup N, Sundler F, Ling C, Mulder H. Enhanced mitochondrial metabolism may account for the adaptation to insulin resistance in islets from C57BL/6J mice fed a high-fat diet. *Diabetologia*. 2007;50(1):74-83.
- Fex M, Haemmerle G, Wierup N, Dekker-Nitert M, Rehn M, Ristow M, Zechner R, Sundler F, Holm C, Eliasson L, Mulder H. A beta cell-specific knockout of hormone-sensitive lipase in mice results in hyperglycaemia and disruption of exocytosis. *Diabetologia*. 2009;52(2):271-80.
- Filling C, Keller B, Hirschberg D, Marschall HU, Jornvall H, Bennett MJ, Oppermann U. Role of short-chain hydroxyacyl CoA dehydrogenases in SCHAD deficiency. *Biochemical and biophysical research communications*. 2008;368(1):6-11.

- Finkel T. Signal transduction by mitochondrial oxidants. *The Journal of Biological Chemistry*. 2012;287(7):4434-40.
- Freeman H, Shimomura K, Horner E, Cox RD, Ashcroft FM. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase: a key role in insulin secretion. *Cell Metabolism*. 2006;3(1):35-45.
- Freemantle N, Holmes J, Hockey A, Kumar S. How strong is the association between abdominal obesity and the incidence of type 2 diabetes? *International journal of clinical practice*. 2008;62(9):1391-6.
- Fu A, Ng AC, Depatie C, Wijesekara N, He Y, Wang GS, Bardeesy N, Scott FW, Touyz RM, Wheeler MB, Sreton RA. Loss of Lkb1 in adult beta cells increases beta cell mass and enhances glucose tolerance in mice. *Cell Metabolism*. 2009;10(4):285-95.
- Fulco M, Cen Y, Zhao P, Hoffman EP, McBurney MW, Sauve AA, Sartorelli V. Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Developmental cell*. 2008;14(5):661-73.
- Gaidhu MP, Anthony NM, Patel P, Hawke TJ, Ceddia RB. Dysregulation of lipolysis and lipid metabolism in visceral and subcutaneous adipocytes by high-fat diet: role of ATGL, HSL, and AMPK. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2010;298(4):C961-71.
- Gallegos LL, Newton AC. Spatiotemporal dynamics of lipid signaling: protein kinase C as a paradigm. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology Life*. 2008;60(12):782-9.
- Ganesan S, Calle R, Zawulich K, Greenawalt K, Zawulich W, Shulman GI, Rasmussen H. Immunocytochemical localization of alpha-protein kinase C in rat pancreatic beta-cells during glucose-induced insulin secretion. *Journal of Cell Biology*. 1992;119(2):313-24.
- Gerard J. [MODY types of diabetes mellitus]. *Revue Médicale de Liège* 2005;60(5-6):439-41.
- Girard J, Postic C, Burcelin R, Guillet I, Leturque A. [Glucose transporters. Physiology and physiopathology]. *Presse Médicale*. 1992;21(42):2053-9.
- Girard J. [Contribution of free fatty acids to impairment of insulin secretion and action. mechanism of beta-cell lipotoxicity]. *Medecine sciences : M/S*. 2005;21 Spec No:19-25.

- Gleason CE, Lu D, Witters LA, Newgard CB, Birnbaum MJ. The role of AMPK and mTOR in nutrient sensing in pancreatic beta-cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(14):10341-51.
- Goldbeter A, Caplan SR. Oscillatory enzymes. *Annual Review of Biophysics & Bioengineering*. 1976;5:449-76.
- Graciano MF, Santos LR, Curi R, Carpinelli AR. NAD(P)H oxidase participates in the palmitate-induced superoxide production and insulin secretion by rat pancreatic islets. *Journal of cellular physiology*. 2011;226(4):1110-7.
- Gravena C, Mathias PC, Ashcroft SJ. Acute effects of fatty acids on insulin secretion from rat and human islets of Langerhans. *Journal of Endocrinology*. 2002;173(1):73-80.
- Greeley SA, Tucker SE, Worrell HI, Skowron KB, Bell GI, Philipson LH. Update in neonatal diabetes. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*. 2010;17(1):13-9.
- Gremlich S, Nolan C, Roduit R, Burcelin R, Peyot ML, Delghingaro-Augusto V, Desvergne B, Michalik L, Prentki M, Wahli W. Pancreatic islet adaptation to fasting is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor alpha transcriptional up-regulation of fatty acid oxidation. *Endocrinology*. 2005;146(1):375-82.
- Griffen SC, Wang J, German MS. A genetic defect in beta-cell gene expression segregates independently from the fa locus in the ZDF rat. *Diabetes*. 2001;50(1):63-8.
- Guay C, Madiraju SR, Aumais A, Joly E, Prentki M. A role for ATP-citrate lyase, malic enzyme, and pyruvate/citrate cycling in glucose-induced insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(49):35657-65.
- Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(5):367-77.
- Gupta D, Kono T, Evans-Molina C. The role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in pancreatic beta cell function and survival: therapeutic implications for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12(12):1036-47.
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular Cell*. 2008;30(2):214-26.

- Hammar H, Berne C. The activity of beta-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in the pancreatic islets of hyperglycaemic mice. *Diabetologia*. 1970;6(5):526-8.
- Hardie DG, Carling D. The AMP-activated protein kinase--fuel gauge of the mammalian cell? *European journal of biochemistry / FEBS*. 1997;246(2):259-73.
- Hardie DG. The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 23):5479-87.
- Hardie DG. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2007;8(10):774-85.
- Hardie DG. AMP-activated protein kinase: an energy sensor that regulates all aspects of cell function. *Genes & development*. 2011a;25(18):1895-908.
- Hardie DG. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor with a key role in metabolic disorders and in cancer. *Biochemical Society Transactions*. 2011b;39(1):1-13.
- Hardy OT, Hohmeier HE, Becker TC, Manduchi E, Doliba NM, Gupta RK, White P, Stoeckert CJ, Jr., Matschinsky FM, Newgard CB, Kaestner KH. Functional genomics of the beta-cell: short-chain 3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase regulates insulin secretion independent of K⁺ currents. *Molecular endocrinology*. 2007;21(3):765-73.
- Hauge-Evans AC, King AJ, Carmignac D, Richardson CC, Robinson IC, Low MJ, Christie MR, Persaud SJ, Jones PM. Somatostatin secreted by islet delta-cells fulfills multiple roles as a paracrine regulator of islet function. *Diabetes*. 2009;58(2):403-11.
- Hawley SA, Pan DA, Mustard KJ, Ross L, Bain J, Edelman AM, Frenguelli BG, Hardie DG. Calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta is an alternative upstream kinase for AMP-activated protein kinase. *Cell Metabolism*. 2005;2(1):9-19.
- Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Aminoff M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpaa M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. *Nature*. 1998;391(6663):184-7.
- Hennige AM, Fritsche A, Strack V, Weigert C, Mischak H, Borboni P, Renn W, Haring HU, Kellerer M. PKC zeta enhances insulin-like growth factor 1-dependent

- mitogenic activity in the rat clonal beta cell line RIN 1046-38. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;290(1):85-90.
- Henquin JC, Cerasi E, Efendic S, Steiner DF, Boitard C. Pancreatic beta-cell mass or beta-cell function? That is the question! *Diabetes, obesity & metabolism*. 2008;10 Suppl 4:1-4.
- Hernandez RM, Wescott GG, Mayhew MW, McJilton MA, Terrian DM. Biochemical and morphogenic effects of the interaction between protein kinase C-epsilon and actin in vitro and in cultured NIH3T3 cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;83(4):532-46.
- Hess B. Periodic patterns in biochemical reactions. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 1997;30(2):121-76.
- Hoppener JW, Jacobs HM, Wierup N, Sotthawes G, Sprong M, de Vos P, Berger R, Sundler F, Ahren B. Human islet amyloid polypeptide transgenic mice: in vivo and ex vivo models for the role of hIAPP in type 2 diabetes mellitus. *Experimental diabetes research*. 2008;2008:697035.
- Horman S, Browne G, Krause U, Patel J, Vertommen D, Bertrand L, Lavoigne A, Hue L, Proud C, Rider M. Activation of AMP-activated protein kinase leads to the phosphorylation of elongation factor 2 and an inhibition of protein synthesis. *Current biology : CB*. 2002;12(16):1419-23.
- Hotamisligil GS, Arner P, Caro JF, Atkinson RL, Spiegelman BM. Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *Journal of Clinical Investigation*. 1995;95(5):2409-15.
- Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM. IRS-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in TNF-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science*. 1996;271(5249):665-8.
- Hull RL, Andrikopoulos S, Verchere CB, Vidal J, Wang F, Cnop M, Prigeon RL, Kahn SE. Increased dietary fat promotes islet amyloid formation and beta-cell secretory dysfunction in a transgenic mouse model of islet amyloid. *Diabetes*. 2003;52(2):372-9.
- Hussain K, Clayton PT, Krywawych S, Chatziandreou I, Mills P, Ginbey DW, Geboers AJ, Berger R, van den Berg IE, Eaton S. Hyperinsulinism of infancy associated with a novel splice site mutation in the SCHAD gene. *Journal of Pediatrics*. 2005;146(5):706-8.

- Idris I, Gray S, Donnelly R. Protein kinase C activation: isozyme-specific effects on metabolism and cardiovascular complications in diabetes. *Diabetologia*. 2001;44(6):659-73.
- Inoki K, Zhu T, Guan KL. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*. 2003;115(5):577-90.
- Inui A, Asakawa A, Bowers CY, Mantovani G, Laviano A, Meguid MM, Fujimiya M. Ghrelin, appetite, and gastric motility: the emerging role of the stomach as an endocrine organ. *FASEB Journal*. 2004;18(3):439-56.
- Ishikawa T, Iwasaki E, Kanatani K, Sugino F, Kaneko Y, Obara K, Nakayama K. Involvement of novel protein kinase C isoforms in carbachol-stimulated insulin secretion from rat pancreatic islets. *Life sciences*. 2005;77(4):462-9.
- Ivarsson R, Quintens R, Dejonghe S, Tsukamoto K, in 't Veld P, Renstrom E, Schuit FC. Redox control of exocytosis: regulatory role of NADPH, thioredoxin, and glutaredoxin. *Diabetes*. 2005;54(7):2132-42.
- Izai K, Uchida Y, Orii T, Yamamoto S, Hashimoto T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. I. Purification and properties of very-long-chain acyl-coenzyme A dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(2):1027-33.
- Jain R, Lammert E. Cell-cell interactions in the endocrine pancreas. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2009;11 Suppl 4:159-67.
- Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW. Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(47):48968-75.
- Jetton TL, Lausier J, LaRock K, Trotman WE, Larmie B, Habibovic A, Peshavaria M, Leahy JL. Mechanisms of compensatory beta-cell growth in insulin-resistant rats: roles of Akt kinase. *Diabetes*. 2005;54(8):2294-304.
- Jin T, Liu L. The Wnt signaling pathway effector TCF7L2 and type 2 diabetes mellitus. *Molecular endocrinology*. 2008;22(11):2383-92.
- Jones PM, Persaud SJ. Protein kinases, protein phosphorylation, and the regulation of insulin secretion from pancreatic beta-cells. *Endocrine Reviews*. 1998;19(4):429-61.

- Joseph JW, Jensen MV, Ilkayeva O, Palmieri F, Alarcon C, Rhodes CJ, Newgard CB. The mitochondrial citrate/isocitrate carrier plays a regulatory role in glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(47):35624-32.
- Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature*. 2006;444(7121):840-6.
- Kargar C, Ktorza A. Anatomical versus functional beta-cell mass in experimental diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2008;10 Suppl 4:43-53.
- Kebede M, Alquier T, Latour MG, Semache M, Tremblay C, Poitout V. The fatty acid receptor GPR40 plays a role in insulin secretion in vivo after high-fat feeding. *Diabetes*. 2008;57(9):2432-7.
- Kelpe CL, Moore PC, Parazzoli SD, Wicksteed B, Rhodes CJ, Poitout V. Palmitate inhibition of insulin gene expression is mediated at the transcriptional level via ceramide synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(32):30015-21.
- Kennedy ED, Rizzuto R, Theler JM, Pralong WF, Bastianutto C, Pozzan T, Wollheim CB. Glucose-stimulated insulin secretion correlates with changes in mitochondrial and cytosolic Ca^{2+} in aequorin-expressing INS-1 cells. *Journal of Clinical Investigation*. 1996;98(11):2524-38.
- Kershaw EE, Flier JS. Adipose tissue as an endocrine organ. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2004;89(6):2548-56.
- Kharouta M, Miller K, Kim A, Wojcik P, Kilimnik G, Dey A, Steiner DF, Hara M. No mantle formation in rodent islets -- the prototype of islet revisited. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2009;85(3):252-7.
- Kiba T, Tanaka K, Numata K, Hoshino M, Misugi K, Inoue S. Ventromedial hypothalamic lesion-induced vagal hyperactivity stimulates rat pancreatic cell proliferation. *Gastroenterology*. 1996;110(3):885-93.
- Klip A, Paquet MR. Glucose transport and glucose transporters in muscle and their metabolic regulation. *Diabetes Care*. 1990;13(3):228-43.
- Knowler WC, Barrett-Connor E, Fowler SE, Hamman RF, Lachin JM, Walker EA, Nathan DM. Reduction in the incidence of type 2 diabetes with lifestyle intervention or metformin. *The New England journal of medicine*. 2002;346(6):393-403.

- Kobayashi K, Forte TM, Taniguchi S, Ishida BY, Oka K, Chan L. The db/db mouse, a model for diabetic dyslipidemia: molecular characterization and effects of Western diet feeding. *Metabolism: clinical and experimental*. 2000;49(1):22-31.
- Kohnke R, Mei J, Park M, York DA, Erlanson-Albertsson C. Fatty acids and glucose in high concentration down-regulates ATP synthase beta-subunit protein expression in INS-1 cells. *Nutritional neuroscience*. 2007;10(5-6):273-8.
- Kojima S, Ueno N, Asakawa A, Sagiya K, Naruo T, Mizuno S, Inui A. A role for pancreatic polypeptide in feeding and body weight regulation. *Peptides*. 2007;28(2):459-63.
- Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metabolism*. 2008;7(1):45-56.
- Kramer H, Cao G, Dugas L, Luke A, Cooper R, Durazo-Arvizu R. Increasing BMI and waist circumference and prevalence of obesity among adults with Type 2 diabetes: the National Health and Nutrition Examination Surveys. *Journal of diabetes and its complications*. 2010;24(6):368-74.
- Kristal BS, Jackson CT, Chung HY, Matsuda M, Nguyen HD, Yu BP. Defects at center P underlie diabetes-associated mitochondrial dysfunction. *Free Radical Biology & Medicine*. 1997;22(5):823-33.
- Kruit JK, Kremer PH, Dai L, Tang R, Ruddie P, de Haan W, Brunham LR, Verchere CB, Hayden MR. Cholesterol efflux via ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1) and cholesterol uptake via the LDL receptor influences cholesterol-induced impairment of beta cell function in mice. *Diabetologia*. 2010;53(6):1110-9.
- Kurth-Kraczek EJ, Hirshman MF, Goodyear LJ, Winder WW. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes*. 1999;48(8):1667-71.
- Kwan EP, Xie L, Sheu L, Nolan CJ, Prentki M, Betz A, Brose N, Gaisano HY. Munc13-1 deficiency reduces insulin secretion and causes abnormal glucose tolerance. *Diabetes*. 2006;55(5):1421-9.
- Lai JC, Cooper AJ. Neurotoxicity of ammonia and fatty acids: differential inhibition of mitochondrial dehydrogenases by ammonia and fatty acyl coenzyme A derivatives. *Neurochemical research*. 1991;16(7):795-803.

- Lamontagne J, Pepin E, Peyot ML, Joly E, Ruderman NB, Poitout V, Madiraju SR, Nolan CJ, Prentki M. Pioglitazone acutely reduces insulin secretion and causes metabolic deceleration of the pancreatic beta-cell at submaximal glucose concentrations. *Endocrinology*. 2009;150(8):3465-74.
- Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y. SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(41):27628-35.
- Lang DA, Matthews DR, Peto J, Turner RC. Cyclic oscillations of basal plasma glucose and insulin concentrations in human beings. *New England Journal of Medicine*. 1979;301(19):1023-7.
- Langerhans P. Beitrage zur mikroskopischen anatomie der bauchspeichel druse. Gustav Lange. 1869.
- Langhi C, Cariou B. [Cholesterol metabolism and beta-cell function]. *Medecine sciences : M/S*. 2010;26(4):385-90.
- Larsson LI, Boder GB, Shaw WN. Changes in the islets of langerhans in the obese Zucker rat. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 1977;36(6):593-8.
- Latour MG, Alquier T, Oseid E, Tremblay C, Jetton TL, Luo J, Lin DC, Poitout V. GPR40 is necessary but not sufficient for fatty acid stimulation of insulin secretion in vivo. *Diabetes*. 2007;56(4):1087-94.
- Laybutt DR, Glandt M, Xu G, Ahn YB, Trivedi N, Bonner-Weir S, Weir GC. Critical reduction in beta-cell mass results in two distinct outcomes over time. Adaptation with impaired glucose tolerance or decompensated diabetes. *Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(5):2997-3005.
- Lazarus NR, Penhos JC, Tanese T, Michaels L, Gutman R, Recant L. Studies on the biological activity of porcine proinsulin. *The Journal of clinical investigation*. 1970;49(3):487-96.
- Le Bacquer O, Kerr-Conte J, Gargani S, Delalleau N, Huyvaert M, Gmyr V, Froguel P, Neve B, Pattou F. TCF7L2 rs7903146 impairs islet function and morphology in non-diabetic individuals. *Diabetologia*. 2012;55(10):2677-81.
- Leahy JL. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Archives of Medical Research*. 2005;36(3):197-209.

- Leclerc I, Rutter GA. AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor?: Regulation by amino acids and calcium ions. *Diabetes*. 2004;53 Suppl 3:S67-74.
- Leclercq IA, Da Silva Morais A, Schroyen B, Van Hul N, Geerts A. Insulin resistance in hepatocytes and sinusoidal liver cells: mechanisms and consequences. *Journal of Hepatology*. 2007;47(1):142-56.
- Lee KS, Yu WJ, Wang MJ, Wu HT, Chang CH, Cheng JT. Autonomic regulation of insulin secretion is changed by pentobarbital in mice. *Neuroscience letters*. 2010;479(1):6-9.
- Leung N, Sakaue T, Carpentier A, Uffelman K, Giacca A, Lewis GF. Prolonged increase of plasma non-esterified fatty acids fully abolishes the stimulatory effect of 24 hours of moderate hyperglycaemia on insulin sensitivity and pancreatic beta-cell function in obese men. *Diabetologia*. 2004;47(2):204-13.
- Li C, Chen P, Palladino A, Narayan S, Russell LK, Sayed S, Xiong G, Chen J, Stokes D, Butt YM, Jones PM, Collins HW, Cohen NA, Cohen AS, Nissim I, Smith TJ, Strauss AW, Matschinsky FM, Bennett MJ, Stanley CA. Mechanism of hyperinsulinism in short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency involves activation of glutamate dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2010;285(41):31806-18.
- Li Y, Xu S, Mihaylova MM, Zheng B, Hou X, Jiang B, Park O, Luo Z, Lefai E, Shyy JY, Gao B, Wierzbicki M, Verbeuren TJ, Shaw RJ, Cohen RA, Zang M. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metabolism*. 2011;13(4):376-88.
- Lin DC, Zhang J, Zhuang R, Li F, Nguyen K, Chen M, Tran T, Lopez E, Lu JY, Li XN, Tang L, Tonn GR, Swaminath G, Reagan JD, Chen JL, Tian H, Lin YJ, Houze JB, Luo J. AMG 837: a novel GPR40/FFA1 agonist that enhances insulin secretion and lowers glucose levels in rodents. *PLoS One*. 2011;6(11):e27270.
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM. Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metabolism*. 2005;1(6):361-70.
- Lindvall H, Nevsten P, Strom K, Wallenberg R, Sundler F, Langin D, Winzell MS, Holm C. A novel hormone-sensitive lipase isoform expressed in pancreatic beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(5):3828-36.

- Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Ronn T, Granhall C, Luthman H, Masiello P, Marchetti P, Groop L, Del Prato S. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia*. 2008;51(4):615-22.
- Liu XJ, He AB, Chang YS, Fang FD. Atypical protein kinase C in glucose metabolism. *Cellular signalling*. 2006;18(12):2071-6.
- Liu YQ, Jetton TL, Leahy JL. beta-Cell adaptation to insulin resistance. Increased pyruvate carboxylase and malate-pyruvate shuttle activity in islets of nondiabetic Zucker fatty rats. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(42):39163-8.
- Lo YY, Wong JM, Cruz TF. Reactive oxygen species mediate cytokine activation of c-Jun NH2-terminal kinases. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996;271(26):15703-7.
- Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005;307(5708):384-7.
- MacDonald MJ, McKenzie DI, Walker TM, Kaysen JH. Lack of glyconeogenesis in pancreatic islets: expression of gluconeogenic enzyme genes in islets. *Hormone and Metabolic Research*. 1992;24(4):158-60.
- MacDonald MJ. Estimates of glycolysis, pyruvate (de)carboxylation, pentose phosphate pathway, and methyl succinate metabolism in incapacitated pancreatic islets. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993;305(2):205-14.
- MacDonald MJ. Feasibility of a mitochondrial pyruvate malate shuttle in pancreatic islets. Further implication of cytosolic NADPH in insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(34):20051-8.
- MacDonald MJ, Fahien LA, Buss JD, Hasan NM, Fallon MJ, Kendrick MA. Citrate oscillates in liver and pancreatic beta cell mitochondria and in INS-1 insulinoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(51):51894-900.
- MacDonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Brown LJ, Hasan NM, Kendrick MA. Acetoacetate and beta-hydroxybutyrate in combination with other metabolites release insulin from INS-1 cells and provide clues about pathways in insulin secretion. *American journal of physiology. Cell physiology*. 2008;294(2):C442-50.
- MacDonald MJ, Longacre MJ, Langberg EC, Tibell A, Kendrick MA, Fukao T, Ostenson CG. Decreased levels of metabolic enzymes in pancreatic islets of patients with type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2009;52(6):1087-91.

- MacDonald MJ, Longacre MJ, Stoker SW, Kendrick M, Thonpho A, Brown LJ, Hasan NM, Jitrapakdee S, Fukao T, Hanson MS, Fernandez LA, Odorico J. Differences between human and rodent pancreatic islets: low pyruvate carboxylase, atp citrate lyase, and pyruvate carboxylation and high glucose-stimulated acetoacetate in human pancreatic islets. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(21):18383-96.
- Maechler P, Wollheim CB. Mitochondrial glutamate acts as a messenger in glucose-induced insulin exocytosis. *Nature*. 1999;402(6762):685-9.
- Magnan C, Ktorza, A. . Production et sécrétion de l'insuline par la cellule β pancréatique. *EMC - Endocrinologie*. 2005;2(4):241-64.
- Magnusson I, Rothman DL, Katz LD, Shulman RG, Shulman GI. Increased rate of gluconeogenesis in type II diabetes mellitus. A ^{13}C nuclear magnetic resonance study. *Journal of Clinical Investigation*. 1992;90(4):1323-7.
- Malaisse WJ, Sener A, Herchuelz A, Hutton JC. Insulin release: the fuel hypothesis. *Metabolism*. 1979;28(4):373-86.
- Malaisse WJ, Best L, Kawazu S, Malaisse-Lagae F, Sener A. The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release: fuel metabolism in islets deprived of exogenous nutrient. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1983;224(1):102-10.
- Martens GA, Vervoort A, Van de Casteele M, Stange G, Hellemans K, Van Thi HV, Schuit F, Pipeleers D. Specificity in beta cell expression of L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, short chain, and potential role in down-regulating insulin release. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(29):21134-44.
- Martins E, Cardoso ML, Rodrigues E, Barbot C, Ramos A, Bennett MJ, Teles EL, Vilarinho L. Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: the clinical relevance of an early diagnosis and report of four new cases. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2011;34(3):835-42.
- Mason TM, Goh T, Tchipashvili V, Sandhu H, Gupta N, Lewis GF, Giacca A. Prolonged elevation of plasma free fatty acids desensitizes the insulin secretory response to glucose in vivo in rats. *Diabetes*. 1999;48(3):524-30.
- Matschinsky F, Liang Y, Kesavan P, Wang L, Froguel P, Velho G, Cohen D, Permutt MA, Tanizawa Y, Jetton TL, et al. Glucokinase as pancreatic beta cell glucose sensor and diabetes gene. *Journal of Clinical Investigation*. 1993;92(5):2092-8.
- Matschinsky FM, Ellerman JE. Metabolism of glucose in the islets of Langerhans. *Journal of Biological Chemistry*. 1968;243(10):2730-6.

- Maxfield FR, van Meer G. Cholesterol, the central lipid of mammalian cells. *Current Opinion in Cell Biology*. 2011;22(4):422-9.
- McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes*. 2002;51(1):7-18.
- Mendez CF, Leibiger IB, Leibiger B, Hoy M, Gromada J, Berggren PO, Bertorello AM. Rapid association of protein kinase C-epsilon with insulin granules is essential for insulin exocytosis. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003;278(45):44753-7.
- Meshkani R, Adeli K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clinical Biochemistry*. 2009;42(13-14):1331-46.
- Michael MD, Kulkarni RN, Postic C, Previs SF, Shulman GI, Magnuson MA, Kahn CR. Loss of insulin signaling in hepatocytes leads to severe insulin resistance and progressive hepatic dysfunction. *Molecular Cell*. 2000;6(1):87-97.
- Miyaki M, Iijima T, Hosono K, Ishii R, Yasuno M, Mori T, Toi M, Hishima T, Shitara N, Tamura K, Utsunomiya J, Kobayashi N, Kuroki T, Iwama T. Somatic mutations of LKB1 and beta-catenin genes in gastrointestinal polyps from patients with Peutz-Jeghers syndrome. *Cancer research*. 2000;60(22):6311-3.
- Miyoshi H, Souza SC, Zhang HH, Strissel KJ, Christoffolete MA, Kovsan J, Rudich A, Kraemer FB, Bianco AC, Obin MS, Greenberg AS. Perilipin promotes hormone-sensitive lipase-mediated adipocyte lipolysis via phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(23):15837-44.
- Molven A, Matre GE, Duran M, Wanders RJ, Rishaug U, Njolstad PR, Jellum E, Sovik O. Familial hyperinsulinemic hypoglycemia caused by a defect in the SCHAD enzyme of mitochondrial fatty acid oxidation. *Diabetes*. 2004;53(1):221-7.
- Mulder H, Yang S, Winzell MS, Holm C, Ahren B. Inhibition of lipase activity and lipolysis in rat islets reduces insulin secretion. *Diabetes*. 2004;53(1):122-8.
- Mulder H, Ling C. Mitochondrial dysfunction in pancreatic beta-cells in Type 2 diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2009;297(1-2):34-40.
- Mureddu GF, Brandimarte F, De Luca L. High-density lipoprotein levels and risk of cardiovascular events: a review. *Journal of Cardiovascular Medicine (Hagerstown)*. 2011.

- Murphy R, Ellard S, Hattersley AT. Clinical implications of a molecular genetic classification of monogenic beta-cell diabetes. *Nature Clinical Practice Endocrinology & Metabolism*. 2008;4(4):200-13.
- Nada MA, Rhead WJ, Sprecher H, Schulz H, Roe CR. Evidence for intermediate channeling in mitochondrial beta-oxidation. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270(2):530-5.
- Newsholme P, Brennan L, Bender K. Amino Acid Metabolism, b-Cell Function, and Diabetes. *Diabetes*. 2006;55(S2):S39-S47.
- Newsholme P, Haber EP, Hirabara SM, Rebelato EL, Procopio J, Morgan D, Oliveira-Emilio HC, Carpinelli AR, Curi R. Diabetes associated cell stress and dysfunction: role of mitochondrial and non-mitochondrial ROS production and activity. *The Journal of physiology*. 2007;583(Pt 1):9-24.
- Newton AC. Lipid activation of protein kinases. *Journal of Lipid Research*. 2009;50 Suppl:S266-71.
- Newton PM, Messing RO. The substrates and binding partners of protein kinase Cepsilon. *The Biochemical journal*. 2010;427(2):189-96.
- Nicholls DG, Ferguson SJ. *Bioenergetics 3*. [3rd ed. San Diego, Calif.: Academic Press; 2002.
- Nilsson T, Schultz V, Berggren PO, Corkey BE, Tornheim K. Temporal patterns of changes in ATP/ADP ratio, glucose 6-phosphate and cytoplasmic free Ca²⁺ in glucose-stimulated pancreatic beta-cells. *Biochemical Journal*. 1996;314 (Pt 1):91-4.
- Noel RJ, Antinozzi PA, McGarry JD, Newgard CB. Engineering of glycerol-stimulated insulin secretion in islet beta cells. Differential metabolic fates of glucose and glycerol provide insight into mechanisms of stimulus-secretion coupling. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(30):18621-7.
- Nolan CJ, Leahy JL, Delghingaro-Augusto V, Moibi J, Soni K, Peyot ML, Fortier M, Guay C, Lamontagne J, Barbeau A, Przybytkowski E, Joly E, Masiello P, Wang S, Mitchell GA, Prentki M. Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling. *Diabetologia*. 2006;49(9):2120-30.
- Nolan CJ, Damm P, Prentki M. Type 2 diabetes across generations: from pathophysiology to prevention and management. *Lancet*. 2011;378(9786):169-81.

- Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, Notario PM, Saravanamuthu S, Nueda ML, Sanchez-Sanchez F, Escribano J, Laborda J, Becerra SP. Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(49):38022-37.
- Nowak G, Bakajsova D, Samarel AM. Protein kinase C-epsilon activation induces mitochondrial dysfunction and fragmentation in renal proximal tubules. *American journal of physiology. Renal physiology*. 2011;301(1):F197-208.
- O'Rahilly S, Turner RC, Matthews DR. Impaired pulsatile secretion of insulin in relatives of patients with non-insulin-dependent diabetes. *New England Journal of Medicine*. 1988;318(19):1225-30.
- Olszewski S, Deeney JT, Schupp GT, Williams KP, Corkey BE, Rhodes CJ. Rab3A effector domain peptides induce insulin exocytosis via a specific interaction with a cytosolic protein doublet. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(45):27987-91.
- Opie EL. The Relation of Diabetes Mellitus to Lesions of the Pancreas. Hyaline Degeneration of the Islands of Langerhans. *Journal of Experimental Medicine*. 1901;5(5):527-40.
- Orci L, Unger RH. Functional subdivision of islets of Langerhans and possible role of D cells. *Lancet*. 1975;2(7947):1243-4.
- Palladino AA, Stanley CA. The hyperinsulinism/hyperammonemia syndrome. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2010;11(3):171-8.
- Patti ME, Corvera S. The role of mitochondria in the pathogenesis of type 2 diabetes. *Endocrine Reviews*. 2010;31(3):364-95.
- Pepin E, Guay C, Delghingaro-Augusto V, Joly E, Madiraju SR, Prentki M. Short-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase is a negative regulator of insulin secretion in response to fuel and non-fuel stimuli in INS832/13 beta-cells. *Journal of diabetes*. 2010;2(3):157-67.
- Perley MJ, Kipnis DM. Plasma insulin responses to oral and intravenous glucose: studies in normal and diabetic subjects. *Journal of Clinical Investigation*. 1967;46(12):1954-62.
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science*. 2003;300(5622):1140-2.

- Petersen KF, Dufour S, Befroy D, Garcia R, Shulman GI. Impaired mitochondrial activity in the insulin-resistant offspring of patients with type 2 diabetes. *The New England journal of medicine*. 2004;350(7):664-71.
- Peyot ML, Nolan CJ, Soni K, Joly E, Lussier R, Corkey BE, Wang SP, Mitchell GA, Prentki M. Hormone-sensitive lipase has a role in lipid signaling for insulin secretion but is nonessential for the incretin action of glucagon-like peptide 1. *Diabetes*. 2004;53(7):1733-42.
- Peyot ML, Guay C, Latour MG, Lamontagne J, Lussier R, Pineda M, Ruderman NB, Haemmerle G, Zechner R, Joly E, Madiraju SR, Poitout V, Prentki M. Adipose triglyceride lipase is implicated in fuel- and non-fuel-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(25):16848-59.
- Peyot ML, Pepin E, Lamontagne J, Latour MG, Zarrouki B, Lussier R, Pineda M, Jetton TL, Madiraju SR, Joly E, Prentki M. Beta-cell failure in diet-induced obese mice stratified according to body weight gain: secretory dysfunction and altered islet lipid metabolism without steatosis or reduced beta-cell mass. *Diabetes*. 2010;59(9):2178-87.
- Pi J, Bai Y, Zhang Q, Wong V, Floering LM, Daniel K, Reece JM, Deeney JT, Andersen ME, Corkey BE, Collins S. Reactive oxygen species as a signal in glucose-stimulated insulin secretion. *Diabetes*. 2007;56(7):1783-91.
- Pi J, Collins S. Reactive oxygen species and uncoupling protein 2 in pancreatic beta-cell function. *Diabetes, obesity & metabolism*. 2010;12 Suppl 2:141-8.
- Pinton P, Tsuboi T, Ainscow EK, Pozzan T, Rizzuto R, Rutter GA. Dynamics of glucose-induced membrane recruitment of protein kinase C beta II in living pancreatic islet beta-cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(40):37702-10.
- Poirier S, Mayer G, Benjannet S, Bergeron E, Marcinkiewicz J, Nassoury N, Mayer H, Nimpf J, Prat A, Seidah NG. The proprotein convertase PCSK9 induces the degradation of low density lipoprotein receptor (LDLR) and its closest family members VLDLR and ApoER2. *The Journal of Biological Chemistry*. 2008;283(4):2363-72.
- Polonsky KS, Given BD, Hirsch LJ, Tillil H, Shapiro ET, Beebe C, Frank BH, Galloway JA, Van Cauter E. Abnormal patterns of insulin secretion in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *New England Journal of Medicine*. 1988;318(19):1231-9.

- Pongratz RL, Kibbey RG, Shulman GI, Cline GW. Cytosolic and mitochondrial malic enzyme isoforms differentially control insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2007;282(1):200-7.
- Porterfield DM, Corkey RF, Sanger RH, Tornheim K, Smith PJ, Corkey BE. Oxygen consumption oscillates in single clonal pancreatic beta-cells (HIT). *Diabetes*. 2000;49(9):1511-6.
- Pratipanawatr W, Pratipanawatr T, Cusi K, Berria R, Adams JM, Jenkinson CP, Maezono K, DeFronzo RA, Mandarino LJ. Skeletal muscle insulin resistance in normoglycemic subjects with a strong family history of type 2 diabetes is associated with decreased insulin-stimulated insulin receptor substrate-1 tyrosine phosphorylation. *Diabetes*. 2001;50(11):2572-8.
- Prekeris R, Mayhew MW, Cooper JB, Terrian DM. Identification and localization of an actin-binding motif that is unique to the epsilon isoform of protein kinase C and participates in the regulation of synaptic function. *Journal of Cell Biology*. 1996;132(1-2):77-90.
- Prekeris R, Hernandez RM, Mayhew MW, White MK, Terrian DM. Molecular analysis of the interactions between protein kinase C-epsilon and filamentous actin. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273(41):26790-8.
- Prentki M, Vischer S, Glennon MC, Regazzi R, Deeney JT, Corkey BE. Malonyl-CoA and long chain acyl-CoA esters as metabolic coupling factors in nutrient-induced insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(9):5802-10.
- Prentki M. New insights into pancreatic beta-cell metabolic signaling in insulin secretion. *European Journal of Endocrinology*. 1996;134(3):272-86.
- Prentki M, Corkey BE. Are the beta-cell signaling molecules malonyl-CoA and cytosolic long-chain acyl-CoA implicated in multiple tissue defects of obesity and NIDDM? *Diabetes*. 1996;45(3):273-83.
- Prentki M, Tornheim K, Corkey BE. Signal transduction mechanisms in nutrient-induced insulin secretion. *Diabetologia*. 1997;40 Suppl 2:S32-41.
- Prentki M, Joly E, El-Assaad W, Roduit R. Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes. *Diabetes*. 2002;51 Suppl 3:S405-13.
- Prentki M, Nolan CJ. Islet beta cell failure in type 2 diabetes. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(7):1802-12.

- Prentki M, Madiraju SR. Glycerolipid metabolism and signaling in health and disease. *Endocrine Reviews*. 2008;29(6):647-76.
- Prentki M, Madiraju SR. Glycerolipid/free fatty acid cycle and islet beta-cell function in health, obesity and diabetes. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2012;353(1-2):88-100.
- Produit-Zengaffinen N, Davis-Lameloise N, Perreten H, Becard D, Gjinovci A, Keller PA, Wollheim CB, Herrera P, Muzzin P, Assimacopoulos-Jeannet F. Increasing uncoupling protein-2 in pancreatic beta cells does not alter glucose-induced insulin secretion but decreases production of reactive oxygen species. *Diabetologia*. 2007;50(1):84-93.
- Qu X, Seale JP, Donnelly R. Tissue and isoform-selective activation of protein kinase C in insulin-resistant obese Zucker rats - effects of feeding. *Journal of Endocrinology*. 1999;162(2):207-14.
- Raddatz K, Turner N, Frangioudakis G, Liao BM, Pedersen DJ, Cantley J, Wilks D, Preston E, Hegarty BD, Leitges M, Raftery MJ, Biden TJ, Schmitz-Peiffer C. Time-dependent effects of Prkce deletion on glucose homeostasis and hepatic lipid metabolism on dietary lipid oversupply in mice. *Diabetologia*. 2011;54(6):1447-56.
- Randle PJ. Regulatory interactions between lipids and carbohydrates: the glucose fatty acid cycle after 35 years. *Diabetes / Metabolism Reviews*. 1998;14(4):263-83.
- Richard AM, Webb DL, Goodman JM, Schultz V, Flanagan JN, Getty-Kaushik L, Deeney JT, Yaney GC, Dunaway GA, Berggren PO, Tornheim K. Tissue-dependent loss of phosphofructokinase-M in mice with interrupted activity of the distal promoter: impairment in insulin secretion. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2007;293(3):E794-801.
- Robson-Doucette CA, Sultan S, Allister EM, Wikstrom JD, Koshkin V, Bhattacharjee A, Prentice KJ, Sereda SB, Shirihi OS, Wheeler MB. {beta}-Cell Uncoupling Protein 2 Regulates Reactive Oxygen Species Production, Which Influences Both Insulin and Glucagon Secretion. *Diabetes*. 2011;60(11):2710-9.
- Roduit R, Masiello P, Wang SP, Li H, Mitchell GA, Prentki M. A role for hormone-sensitive lipase in glucose-stimulated insulin secretion: a study in hormone-sensitive lipase-deficient mice. *Diabetes*. 2001;50(9):1970-5.
- Roduit R, Nolan C, Alarcon C, Moore P, Barbeau A, Delghingaro-Augusto V, Przybykowski E, Morin J, Masse F, Massie B, Ruderman N, Rhodes C, Poitout V,

- Prentki M. A role for the malonyl-CoA/long-chain acyl-CoA pathway of lipid signaling in the regulation of insulin secretion in response to both fuel and nonfuel stimuli. *Diabetes*. 2004;53(4):1007-19.
- Ronnebaum SM, Ilkayeva O, Burgess SC, Joseph JW, Lu D, Stevens RD, Becker TC, Sherry AD, Newgard CB, Jensen MV. A pyruvate cycling pathway involving cytosolic NADP-dependent isocitrate dehydrogenase regulates glucose-stimulated insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2006;281(41):30593-602.
- Rubi B, del Arco A, Bartley C, Satrustegui J, Maechler P. The malate-aspartate NADH shuttle member Aralar1 determines glucose metabolic fate, mitochondrial activity, and insulin secretion in beta cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(53):55659-66.
- Ruderman N, Prentki M. AMP kinase and malonyl-CoA: targets for therapy of the metabolic syndrome. *Nature reviews. Drug discovery*. 2004;3(4):340-51.
- Ruderman NB, Xu XJ, Nelson L, Cacicedo JM, Saha AK, Lan F, Ido Y. AMPK and SIRT1: a long-standing partnership? *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2010;298(4):E751-60.
- Rutter GA, Da Silva Xavier G, Leclerc I. Roles of 5'-AMP-activated protein kinase (AMPK) in mammalian glucose homeostasis. *The Biochemical journal*. 2003;375(Pt 1):1-16.
- Saadeh M, Ferrante TC, Kane A, Shirihai O, Corkey BE, Deeney JT. Reactive oxygen species stimulate insulin secretion in rat pancreatic islets: studies using mono-oleoyl-glycerol. *PLoS One*. 2012;7(1):e30200.
- Sako Y, Grill VE. A 48-hour lipid infusion in the rat time-dependently inhibits glucose-induced insulin secretion and B cell oxidation through a process likely coupled to fatty acid oxidation. *Endocrinology*. 1990;127(4):1580-9.
- Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(12):7265-70.
- Schmidt MF. Fatty acylation of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989;988(3):411-26.
- Schmitz-Peiffer C, Browne CL, Oakes ND, Watkinson A, Chisholm DJ, Kraegen EW, Biden TJ. Alterations in the expression and cellular localization of protein kinase C

- isozymes epsilon and theta are associated with insulin resistance in skeletal muscle of the high-fat-fed rat. *Diabetes*. 1997;46(2):169-78.
- Schmitz-Peiffer C, Laybutt DR, Burchfield JG, Gurisik E, Narasimhan S, Mitchell CJ, Pedersen DJ, Braun U, Cooney GJ, Leitges M, Biden TJ. Inhibition of PKCepsilon improves glucose-stimulated insulin secretion and reduces insulin clearance. *Cell Metabolism*. 2007;6(4):320-8.
- Schmitz-Peiffer C, Biden TJ. Protein kinase C function in muscle, liver, and beta-cells and its therapeutic implications for type 2 diabetes. *Diabetes*. 2008;57(7):1774-83.
- Schmitz O, Porksen N, Nyholm B, Skjaerbaek C, Butler PC, Veldhuis JD, Pincus SM. Disorderly and nonstationary insulin secretion in relatives of patients with NIDDM. *American Journal of Physiology*. 1997;272(2 Pt 1):E218-26.
- Schoonbroodt S, Piette J. Oxidative stress interference with the nuclear factor-kappa B activation pathways. *Biochemical pharmacology*. 2000;60(8):1075-83.
- Schuit F, De Vos A, Farfari S, Moens K, Pipeleers D, Brun T, Prentki M. Metabolic fate of glucose in purified islet cells. Glucose-regulated anaplerosis in beta cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 1997;272(30):18572-9.
- Schulz H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1991;1081(2):109-20.
- Schulz N, Himmelbauer H, Rath M, van Weeghel M, Houten S, Kulik W, Suhre K, Scherneck S, Vogel H, Kluge R, Wiedmer P, Joost HG, Schurmann A. Role of medium- and short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase in the regulation of body weight and thermogenesis. *Endocrinology*. 2011;152(12):4641-51.
- Sekine N, Cirulli V, Regazzi R, Brown LJ, Gine E, Tamarit-Rodriguez J, Girotti M, Marie S, MacDonald MJ, Wollheim CB, et al. Low lactate dehydrogenase and high mitochondrial glycerol phosphate dehydrogenase in pancreatic beta-cells. Potential role in nutrient sensing. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269(7):4895-902.
- Semple RK, Chatterjee VK, O'Rahilly S. PPAR gamma and human metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*. 2006;116(3):581-9.
- Shimizu T, Parker JC, Najafi H, Matschinsky FM. Control of glucose metabolism in pancreatic beta-cells by glucokinase, hexokinase, and phosphofructokinase. Model study with cell lines derived from beta-cells. *Diabetes*. 1988;37(11):1524-30.

- Shirai Y, Kashiwagi K, Yagi K, Sakai N, Saito N. Distinct effects of fatty acids on translocation of gamma- and epsilon-subspecies of protein kinase C. *The Journal of cell biology*. 1998;143(2):511-21.
- Shulman GI, Rothman DL, Jue T, Stein P, DeFronzo RA, Shulman RG. Quantitation of muscle glycogen synthesis in normal subjects and subjects with non-insulin-dependent diabetes by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *New England Journal of Medicine*. 1990;322(4):223-8.
- Silverthorn DU. *Human Physiology: an integrated approach*. Toronto: Prentice Hall; 1998.
- Sladek R, Rocheleau G, Rung J, Dina C, Shen L, Serre D, Boutin P, Vincent D, Belisle A, Hadjadj S, Balkau B, Heude B, Charpentier G, Hudson TJ, Montpetit A, Pshezhetsky AV, Prentki M, Posner BI, Balding DJ, Meyre D, Polychronakos C, Froguel P. A genome-wide association study identifies novel risk loci for type 2 diabetes. *Nature*. 2007;445(7130):881-5.
- Smirnova E, Goldberg EB, Makarova KS, Lin L, Brown WJ, Jackson CL. ATGL has a key role in lipid droplet/adiposome degradation in mammalian cells. *EMBO Rep*. 2006;7(1):106-13.
- Somers G, Carpinelli AR, Devis G, Sener A, Malaisse WJ. The stimulus-secretion coupling of amino acid-induced insulin release. Biosynthetic and secretory responses of rat pancreatic islet to L-leucine and L-glutamine. *Diabetologia*. 1981;21(2):135-42.
- Stark R, Pasquel F, Turcu A, Pongratz RL, Roden M, Cline GW, Shulman GI, Kibbey RG. Phosphoenolpyruvate cycling via mitochondrial phosphoenolpyruvate carboxykinase links anaplerosis and mitochondrial GTP with insulin secretion. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284(39):26578-90.
- Stefan N, Stumvoll M, Bogardus C, Tataranni PA. Elevated plasma nonesterified fatty acids are associated with deterioration of acute insulin response in IGT but not NGT. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2003;284(6):E1156-61.
- Stein DT, Stevenson BE, Chester MW, Basit M, Daniels MB, Turley SD, McGarry JD. The insulinotropic potency of fatty acids is influenced profoundly by their chain length and degree of saturation. *Journal of Clinical Investigation*. 1997;100(2):398-403.
- Steinberg GR, Kemp BE. AMPK in Health and Disease. *Physiological reviews*. 2009;89(3):1025-78.

- Steiner DJ, Kim A, Miller K, Hara M. Pancreatic islet plasticity: interspecies comparison of islet architecture and composition. *Islets*. 2010;2(3):135-45.
- Straub SG, Sharp GW. Glucose-stimulated signaling pathways in biphasic insulin secretion. *Diabetes/metabolism research and reviews*. 2002;18(6):451-63.
- Sun G, Tarasov AI, McGinty J, McDonald A, da Silva Xavier G, Gorman T, Marley A, French PM, Parker H, Gribble F, Reimann F, Prendiville O, Carzaniga R, Viollet B, Leclerc I, Rutter GA. Ablation of AMP-activated protein kinase $\alpha 1$ and $\alpha 2$ from mouse pancreatic beta cells and RIP2.Cre neurons suppresses insulin release in vivo. *Diabetologia*. 2010a;53(5):924-36.
- Sun G, Tarasov AI, McGinty JA, French PM, McDonald A, Leclerc I, Rutter GA. LKB1 deletion with the RIP2.Cre transgene modifies pancreatic beta-cell morphology and enhances insulin secretion in vivo. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2010b;298(6):E1261-73.
- Sutherland C, O'Brien RM, Granner DK. New connections in the regulation of PEPCK gene expression by insulin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1996;351(1336):191-9.
- Terpstra AH. Differences between humans and mice in efficacy of the body fat lowering effect of conjugated linoleic acid: role of metabolic rate. *The Journal of nutrition*. 2001;131(7):2067-8.
- Thomson DM, Brown JD, Fillmore N, Condon BM, Kim HJ, Barrow JR, Winder WW. LKB1 and the regulation of malonyl-CoA and fatty acid oxidation in muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*. 2007;293(6):E1572-9.
- Thorens B, Sarkar HK, Kaback HR, Lodish HF. Cloning and functional expression in bacteria of a novel glucose transporter present in liver, intestine, kidney, and beta-pancreatic islet cells. *Cell*. 1988;55(2):281-90.
- Tian YM, Urquidi V, Ashcroft SJ. Protein kinase C in beta-cells: expression of multiple isoforms and involvement in cholinergic stimulation of insulin secretion. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 1996;119(2):185-93.
- Tiano JP, Delghingaro-Augusto V, Le May C, Liu S, Kaw MK, Khuder SS, Latour MG, Bhatt SA, Korach KS, Najjar SM, Prentki M, Mauvais-Jarvis F. Estrogen receptor activation reduces lipid synthesis in pancreatic islets and prevents beta cell failure in rodent models of type 2 diabetes. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(8):3331-42.

- Tordjman K, Standley KN, Bernal-Mizrachi C, Leone TC, Coleman T, Kelly DP, Semenkovich CF. PPARalpha suppresses insulin secretion and induces UCP2 in insulinoma cells. *Journal of Lipid Research*. 2002;43(6):936-43.
- Uchida Y, Izai K, Orii T, Hashimoto T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267(2):1034-41.
- van Raalte DH, Diamant M. Glucolipotoxicity and beta cells in type 2 diabetes mellitus: target for durable therapy? *Diabetes Research and Clinical Practice*. 2011;93 Suppl 1:S37-46.
- Vasavada RC, Wang L, Fujinaka Y, Takane KK, Rosa TC, Mellado-Gil JM, Friedman PA, Garcia-Ocana A. Protein kinase C-zeta activation markedly enhances beta-cell proliferation: an essential role in growth factor mediated beta-cell mitogenesis. *Diabetes*. 2007;56(11):2732-43.
- Vaxillaire MF, P. The genetics of Type 2 Diabetes: From candidate gene biology to genome-wide studies. In: Holt RIG, editor. *Textbook of diabetes*. 4th ed. Chichester, West Sussex ; Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2010. p. 191-214.
- Verma AK, Wheeler DL, Aziz MH, Manoharan H. Protein kinase Cepsilon and development of squamous cell carcinoma, the nonmelanoma human skin cancer. *Molecular carcinogenesis*. 2006;45(6):381-8.
- Vettor R, Granzotto M, De Stefani D, Trevisan E, Rossato M, Farina MG, Milan G, Pilon C, Nigro A, Federspil G, Vigneri R, Vitiello L, Rizzuto R, Baratta R, Frittitta L. Loss-of-function mutation of the GPR40 gene associates with abnormal stimulated insulin secretion by acting on intracellular calcium mobilization. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2008;93(9):3541-50.
- Viollet B, Mounier R, Leclerc J, Yazigi A, Foretz M, Andreelli F. Targeting AMP-activated protein kinase as a novel therapeutic approach for the treatment of metabolic disorders. *Diabetes & metabolism*. 2007;33(6):395-402.
- Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. Toronto: John Wiley and sons Inc.; 1995.
- Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G, McCulloch LJ, Ferreira T, Grallert H, Amin N, Wu G, Willer CJ, Raychaudhuri S, McCarroll SA, Langenberg C, Hofmann OM, Dupuis J, Qi L, Segre AV, van Hoek M, Navarro P, Ardlie K, Balkau B,

Benediktsson R, Bennett AJ, Blagieva R, Boerwinkle E, Bonnycastle LL, Bengtsson Bostrom K, Bravenboer B, Bumpstead S, Burt NP, Charpentier G, Chines PS, Cornelis M, Couper DJ, Crawford G, Doney AS, Elliott KS, Elliott AL, Erdos MR, Fox CS, Franklin CS, Ganser M, Gieger C, Grarup N, Green T, Griffin S, Groves CJ, Guiducci C, Hadjadj S, Hassanali N, Herder C, Isomaa B, Jackson AU, Johnson PR, Jorgensen T, Kao WH, Klopp N, Kong A, Kraft P, Kuusisto J, Lauritzen T, Li M, Lieveise A, Lindgren CM, Lyssenko V, Marre M, Meitinger T, Midthjell K, Morken MA, Narisu N, Nilsson P, Owen KR, Payne F, Perry JR, Petersen AK, Platou C, Proenca C, Prokopenko I, Rathmann W, Rayner NW, Robertson NR, Rocheleau G, Roden M, Sampson MJ, Saxena R, Shields BM, Shrader P, Sigurdsson G, Sparso T, Strassburger K, Stringham HM, Sun Q, Swift AJ, Thorand B, Tichet J, Tuomi T, van Dam RM, van Haeften TW, van Herpt T, van Vliet-Ostaptchouk JV, Walters GB, Weedon MN, Wijmenga C, Witteman J, Bergman RN, Cauchi S, Collins FS, Gloyn AL, Gyllenstein U, Hansen T, Hide WA, Hitman GA, Hofman A, Hunter DJ, Hveem K, Laakso M, Mohlke KL, Morris AD, Palmer CN, Pramstaller PP, Rudan I, Sijbrands E, Stein LD, Tuomilehto J, Uitterlinden A, Walker M, Wareham NJ, Watanabe RM, Abecasis GR, Boehm BO, Campbell H, Daly MJ, Hattersley AT, Hu FB, Meigs JB, Pankow JS, Pedersen O, Wichmann HE, Barroso I, Florez JC, Frayling TM, Groop L, Sladek R, Thorsteinsdottir U, Wilson JF, Illig T, Froguel P, van Duijn CM, Stefansson K, Altshuler D, Boehnke M, McCarthy MI. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature genetics*. 2010;42(7):579-89.

Vredendaal PJ, van den Berg IE, Malingre HE, Stroobants AK, Olde Weghuis DE, Berger R. Human short-chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase: cloning and characterization of the coding sequence. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;223(3):718-23.

Wang CZ, Wang Y, Di A, Magnuson MA, Ye H, Roe MW, Nelson DJ, Bell GI, Philipson LH. 5-amino-imidazole carboxamide riboside acutely potentiates glucose-stimulated insulin secretion from mouse pancreatic islets by KATP channel-dependent and -independent pathways. *Biochemical and biophysical research communications*. 2005;330(4):1073-9.

Wang S, Soni KG, Semache M, Casavant S, Fortier M, Pan L, Mitchell GA. Lipolysis and the integrated physiology of lipid energy metabolism. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2008;95(3):117-26.

Warwar N, Efendic S, Ostenson CG, Haber EP, Cerasi E, Nesher R. Dynamics of glucose-induced localization of PKC isoenzymes in pancreatic beta-cells: diabetes-related changes in the GK rat. *Diabetes*. 2006;55(3):590-9.

- Wendel AA, Lewin TM, Coleman RA. Glycerol-3-phosphate acyltransferases: rate limiting enzymes of triacylglycerol biosynthesis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2009;1791(6):501-6.
- Williamson JR, Kreisberg RA, Felts PW. Mechanism for the stimulation of gluconeogenesis by fatty acids in perfused rat liver. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1966;56(1):247-54.
- Wojtaszewski JF, Mourtzakis M, Hillig T, Saltin B, Pilegaard H. Dissociation of AMPK activity and ACCbeta phosphorylation in human muscle during prolonged exercise. *Biochemical and biophysical research communications*. 2002;298(3):309-16.
- Xia F, Xie L, Mihic A, Gao X, Chen Y, Gaisano HY, Tsushima RG. Inhibition of cholesterol biosynthesis impairs insulin secretion and voltage-gated calcium channel function in pancreatic beta-cells. *Endocrinology*. 2008;149(10):5136-45.
- Xu J, Han J, Long YS, Epstein PN, Liu YQ. The role of pyruvate carboxylase in insulin secretion and proliferation in rat pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2008a;51(11):2022-30.
- Xu J, Han J, Long YS, Lock J, Weir GC, Epstein PN, Liu YQ. Malic enzyme is present in mouse islets and modulates insulin secretion. *Diabetologia*. 2008b;51(12):2281-9.
- Yaney GC, Corkey BE. Fatty acid metabolism and insulin secretion in pancreatic beta cells. *Diabetologia*. 2003;46(10):1297-312.
- Ye JM, Dzamko N, Cleasby ME, Hegarty BD, Furler SM, Cooney GJ, Kraegen EW. Direct demonstration of lipid sequestration as a mechanism by which rosiglitazone prevents fatty-acid-induced insulin resistance in the rat: comparison with metformin. *Diabetologia*. 2004;47(7):1306-13.
- Zawalich WS, Zawalich KC. Regulation of insulin secretion by phospholipase C. *The American journal of physiology*. 1996;271(3 Pt 1):E409-16.
- Zhang BB, Zhou G, Li C. AMPK: an emerging drug target for diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metabolism*. 2009;9(5):407-16.
- Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Experimental diabetes research*. 2008;2008:704045.

- Zheng D, MacLean PS, Pohnert SC, Knight JB, Olson AL, Winder WW, Dohm GL. Regulation of muscle GLUT-4 transcription by AMP-activated protein kinase. *Journal of applied physiology*. 2001;91(3):1073-83.
- Zhou YP, Berggren PO, Grill V. A fatty acid-induced decrease in pyruvate dehydrogenase activity is an important determinant of beta-cell dysfunction in the obese diabetic db/db mouse. *Diabetes*. 1996;45(5):580-6.
- Zisman A, Peroni OD, Abel ED, Michael MD, Mauvais-Jarvis F, Lowell BB, Wojtaszewski JF, Hirshman MF, Virkamaki A, Goodyear LJ, Kahn CR, Kahn BB. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance. *Nature Medicine*. 2000;6(8):924-8.

